

60 例非小细胞肺癌中 IL-21R、MMP-2 的表达及意义

但卫斌¹, 黄小芳¹, 吴大和¹, 王礼¹, 戈伟²

(1. 通城县人民医院, 湖北 咸宁 437400;

2. 湖北省人民医院肿瘤中心, 湖北 武汉 430060)

摘要: [目的] 探讨非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织中 IL-21R 与 MMP-2 的表达及其在 NSCLC 增长和转移中的作用。[方法] 检测并比较 60 例非小细胞肺癌组织以及 60 例正常肺组织中 IL-21R、MMP-2 的表达, 比较其阳性表达率与 NSCLC 患者恶性生物学行为的关系, 并进行相关性及预后分析。[结果] IL-21R、MMP-2 阳性率在 NSCLC 中的表达显著性高于癌旁正常组织 ($P < 0.05$)。IL-21R 与肿瘤直径有关, IL-21R 和 MMP-2 的表达与淋巴结转移、组织分化、临床分期均相关 ($P < 0.05$)。多因素 Logistic 回归分析显示, IL-21R 和 MMP-2 高水平表达、淋巴结转移、组织学分化、临床分期是 NSCLC 患者的独立预后因素。[结论] NSCLC 中 IL-21R 表达和 MMP-2 表达与肿瘤恶性生物学行为有关, 可作为肺癌预后的客观指标。

主题词: 非小细胞肺癌; 白介素-21 受体; 基质金属蛋白酶-2; 相关性

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2017)07-0610-05

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2017.07.B010

Expression and Significance of IL-21R and MMP-2 in 60 Cases with Non-small Cell Lung Cancer

DAN Wei-bin, HUANG Xiao-fang, WU Da-he, et al.

(Tongcheng People's Hospital of Hubei Province, Xianning 437400, China)

Abstract: [Objective] To investigate the expression of interleukin-21 receptor IL-21R (IL-21R) and matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and its role in the growth and metastasis of NSCLC. [Methods] The expression IL-21R and MMP-2 in 60 cases with NSCLC and 60 cases of normal lung tissue were detected. The relationship between the positive expression of IL-21R and MMP-2 and the biological features of NSCLC patients was compared and the correlation analysis was undertaken. [Results] The positive rate of IL-21R and MMP-2 in NSCLC were significantly higher than those in adjacent normal tissues, and the expression of IL-21R and MMP-2 showed negative correlation ($P < 0.05$). IL-21R was related to tumor diameter, and the expression of IL-21R and MMP-2 was related to lymph node metastasis, tissue differentiation and clinical stage ($P < 0.05$). Multivariate regression analysis showed that IL-21R and MMP-2 highly expressed, lymph node metastasis, histological differentiation and clinical stage were independent prognostic factors in patients with NSCLC. [Conclusion] Expression of IL-21R and MMP-2 in NSCLC are related to the malignant biological behavior of the tumor, which can be used as an objective index for the prognosis of lung cancer.

Subject words: non-small cell lung cancer; interleukin-21 receptor; matrix metalloproteinase-2; correlation

肺癌是最常见的呼吸系统恶性肿瘤, 肺癌中最常见的病理类型是非小细胞肺癌 (non-small-cell lung cancer, NSCLC)^[1,2]。国内外研究均证实导致肺癌患者最终死亡的首要原因是肺癌的侵袭性转移。

通讯作者: 黄小芳, 主治医师, 硕士; 通城县人民医院肿瘤科, 湖北省通城县民主路 170 号 (437400); E-mail: 40830080@qq.com
收稿日期: 2016-08-24; **修回日期:** 2017-03-09

IL-21 是 CD4⁺T 细胞合成的一种细胞因子, 具有抑瘤作用, IL-21 发挥细胞免疫调节功能必须依赖 IL-21 受体的存在。白细胞介素-21 受体 (interleukin-21 receptor, IL-21R) 与 IL-12 β 受体最相近, 表达于 NK 细胞、T 细胞和 B 细胞系^[3]。IL-21 与 IL-21R 相结合后诱导细胞凋亡, 发挥抗肿瘤功能。金属离子依赖蛋

白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)能降解细胞基底膜和细胞外基质中的多种蛋白成分,从而促使肺癌向周围及远处组织发生侵袭和转移^[4]。在众多MMPs中,能够促进肿瘤细胞浸润转移以及降解细胞外基质的是基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2, MMP-2),有研究发现其是肿瘤侵袭转移的标志物之一,并且认为其与恶性肿瘤的浸润转移有着一定的联系^[5]。本研究拟通过检测60例NSCLC患者IL-21R以及MMP-2表达水平,探讨其与NSCLC临床恶性生物学行为的相关性,分析IL-21R、MMP-2在NSCLC中发展进程和浸润转移过程发挥的作用。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取2010年1月至2011年12月来我院就诊NSCLC患者60例,男性29例,女性31例,年龄39~86岁,平均年龄 62.5 ± 23.2 岁。选取术中切除的60例肺癌组织作为实验组样本,所有切除标本均经病理确诊为NSCLC。组织学分型鳞癌33例,腺癌27例。临床分期依据2009年国际肺癌研究中心(I-ASLC)修订的标准进行,其中I期19例,II期17例,III期(III A+III B)24例;中、低分化27例,中分化20例和高分化13例;无淋巴结转移19例,淋巴结转移41例。所有患者手术前均无化疗及放疗和免疫治疗。排除有精神障碍和合并其他重大疾病者。另外选取癌旁正常肺组织(>肿瘤边缘5cm)为对照样本60例。实验获得医院伦理委员会批准,并且获得患者以及家属的知情同意。

1.2 研究方法

试剂:DAB显色试剂盒、鼠抗人单克隆抗体IL-21R以及鼠抗人单克隆抗体MMP-2SP试剂盒(福州迈新生物技术开发有限公司生产)。

免疫组化法:标本均采用10%浓度福尔马林进行固定,然后石蜡包埋,采用4 μ m连续切片。烘烤温度设在65℃,4h后采用常规脱蜡和水化,使用3%过氧化氢灭活内源性过氧化氢酶5min。接下来微波加热,用以修复抗原。然后进行封闭,采用10%正常血清,后滴加一抗(IL-21R、MMP-2),放入冰箱孵育,4℃过夜,滴加二抗多聚体,在室温下孵育半小时,显

色试剂采用DAB,然后复染用苏木素,最后封固采用中性树胶。操作步骤严格按试剂盒说明书进行,采用免疫组化两步法,用已知阳性切片作为阳性对照,阴性对照用PBS代替一抗。染色阳性是指镜下肿瘤细胞浆中呈现棕黄色颗粒,阴性对照(PBS液替代一抗)和阳性对照(已知阳性的癌组织)染色结果均采用此方法。

评判标准:阳性细胞百分数评分的标准是当阳性细胞数<10%为0分,阳性细胞数10%~25%为1分,阳性细胞数26%~50%为2分,阳性细胞数>50%为3分。最后评价可以依据阳性细胞数和染色强度,每张切片随机观察10个视野,染色强度评分的标准:0分为阴性,1分即为弱阳性,2分为阳性,3分为强阳性。最后,把两项评分求和后得出最终评分结果:总分0~1分则为(-),2~3分则为(+),4~5分则为(++),>6分则为(+++)。

1.3 统计学处理

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析。计量资料用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组内治疗前后比较采用配对 t 检验,两组间比较采用独立 t 检验;计数资料以百分比(%)表示,采用 χ^2 检验;相关性采用Spearman相关性分析;将单因素分析中具有统计学差异的指标进行非条件多因素Logistic回归分析。 $P < 0.05$ 为差异具统计学意义。

2 结果

2.1 两组IL-21R和MMP-2表达水平比较

肺癌组IL-21R表达阳性35例(58.33%),MMP-2表达阳性39例(65.00%),另外在对照组中,MMP-2表达阳性8例(13.33%),IL-21R表达阳性13例(21.67%)。NSCLC组织中IL-21R、MMP-2的阳性表达率显著性高于对照组癌旁正常肺组织(均 $P < 0.05$)(Table 1、Figure 1)。

2.2 IL-21R表达与临床病理间的相关性

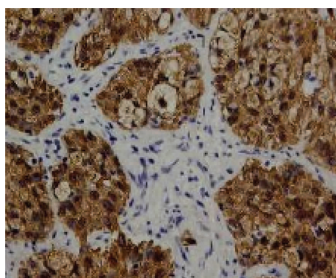
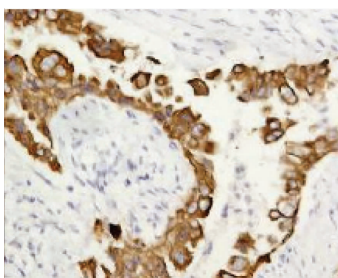
IL-21R在NSCLC组织中的表达与年龄、性别、有无吸烟、组织学分型无关(均 $P > 0.05$),但是与肿瘤直径、淋巴结转移、组织学分化、临床分期明显相关,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)(Table 2)。

2.3 MMP-2表达与生物学行为的相关性

MMP-2在NSCLC组织中的表达与年龄、性别、

Table 1 Comparison of the expression of IL-21R and MMP-2 in the two groups

Groups	N	IL-21R		MMP-2	
		+	%	+	%
NSCLC	60	35	58.33	39	65
Control group	60	13	21.67	8	13.33
χ^2		16.800		33.600	
P		<0.001		<0.001	

**Figure 1 IL-21R positive expression in adenocarcinoma (SP×400)****Figure 2 MMP-2 positive expression in squamous cell carcinoma (SP×400)****Table 2 Relationship between expression of IL-21R and the biological features in NSCLC**

Features	N	IL-21R		χ^2	P
		+	%		
Age(years)					
≤60	26	10	38.46	0.194	0.66
>60	34	15	44.12		
Gender					
Male	29	11	37.93	0.322	0.57
Female	31	14	45.16		
Tumor size(cm)					
≤3	19	8	42.11	8.839	0.003
>3	41	33	80.49		
Smoking					
Yes	26	11	42.31	0.134	0.714
No	34	16	47.06		
Histological classification					
Squamous cell carcinoma	33	12	36.36	0.848	0.357
Adenocarcinoma	27	13	48.15		
Lymph node status					
Yes	41	12	29.27	8.189	0.004
No	19	13	68.42		
Histological differentiation					
Low	27	24	88.89	14.310	0.001
Medium	20	11	55.00		
High	13	4	30.77		
Clinical stages					
I	19	9	47.37	8.342	0.015
II	17	10	58.82		
III	24	21	87.50		

肿瘤直径、有无吸烟、组织学分型无关(均 $P>0.05$),但是与淋巴结转移、组织学分化、临床分期明显相关,差异有统计学意义(均 $P<0.05$)(Table 3)。

2.4 随访结果

所有患者均随访 5 年,1 年内死亡组 IL-21R 阳性表达率为 81.82%(18/22),存活 3 年组 IL-21R 阳性表达率为 66.67%(8/12),5 年以上存活组 IL-21R 阳性

表达率为 33.33%(9/27);MMP-2 阳性表达率则分别为 90.91%(20/22)、83.33%(10/12)和 33.33%(9/27)。NSCLC 术后仅存活 1 年和存活 3 年者,其 IL-21R 和 MMP-2 蛋白阳性表达率显著性高于 5 年或 5 年以上存活者($P<0.01$)。

2.5 NSCLC 患者预后多因素分析

治疗前 IL-21R 和 MMP-2 高水平表达、淋巴结转移、组织学分化、临床分期是 NSCLC 患者的独立预后因素(Table 4)。

2.6 NSCLC 组织中 IL-21R 与 MMP-2 相关性分析

NSCLC 组织中,IL-21R 与 MMP-2 表达均阳性 16 例,均阴性 21 例。IL-21R 的表达与 MMP-2 的表达呈负相关($r=-0.478$)($P<0.05$)(Table 5)。

3 讨论

目前国外研究者发现 IL-21 功能必须依赖 IL-21R 的作用,IL-21 与受体结合以后,可以通过 γ 链进行信号的传导,并且诱导活化 CD⁺8T 细胞,促进其抗肿瘤功能的实现^[6]。研究发现了 IL-21R 缺陷的小鼠体内,IL-21 抗肿瘤作用减弱或消退,目前认为 IL-21 在小鼠实体瘤模型中有较大的抗肿瘤能力^[7]。较多学者认可 IL-21 细胞因子有抗肿瘤作用。本次研究肺癌组 60 例 NSCLC 组织中,IL-21R 表达阳性 35 例(58.33%),对照组的癌旁正常组织中 IL-21R 表达阳性 13 例(21.67%)。结果显示肺癌组 IL-21R 的阳性表达率明显高于对照组 ($P<0.05$),与既往研究报道一致^[8]。

已有的大量研究显示,MMP-2 过度表达在多种肿瘤组织中均可检测出来,并发现肿瘤的侵袭转移及预后与 MMP-2 相关,对预测肿瘤转移以及复发的风险有一定的价值^[9]。同时 MMP-2 是由结

Table 3 Relationship between expression of MMP-2 and the biological feature in NSCLC

Features	N	MMP-2		χ^2	P
		+	%		
Age(years)					
≤60	26	17	65.38	0.268	0.604
>60	34	20	58.82		
Gender					
Male	29	18	62.07	0.039	0.844
Female	31	20	64.52		
Tumor size(cm)					
≤3	19	11	57.89	0.963	0.326
>3	41	29	70.73		
Smoking					
Yes	26	19	73.08	2.527	0.112
No	34	18	52.94		
Histological classification					
Squamous cell carcinoma	33	20	60.61	0.235	0.628
Adenocarcinoma	27	18	66.67		
Lymph node status					
Yes	41	36	87.80	16.610	<0.001
No	19	7	36.84		
Histological differentiation					
Low	27	24	88.89	13.810	0.001
Medium	20	13	65.00		
High	13	4	30.77		
Clinical stages					
I	19	6	31.58	14.310	0.001
II	17	11	64.71		
III	24	21	87.50		

Table 4 Multivariate analysis of prognostic factors in patients with NSCLC

Features	β	P	OR	95%CI
Lymph node status	1.594	0.012	4.149	1.246~3.202
Histological classification	1.796	0.013	5.318	0.197~0.485
Clinical stages/ I + III +(III A/III B)	2.179	0.008	3.758	0.801~4.103
IL-21R high/low expression	1.607	0.031	4.679	1.032~2.745
MMP-2 high/low expression	1.634	0.016	6.763	0.984~3.201

Table 5 Correlation between IL-21R and MMP-2 in NSCLC tissue

IL-21R	N	MMP-2		r
		+	-	
+	35	16	19	-0.478
-	25	23	2	
Total	60	39	21	

缔组织细胞分泌的,它能够降解细胞外基质,MMPs结构上具有较大同源性,可以在肿瘤侵袭、转移过程中和细胞外基质构成以及人体伤口愈合时发挥

一定的作用。本次研究对照组癌旁正常组织MMP-2表达阳性有8例(13.33%),然而肺癌组NSCLC组织中,MMP-2表达阳性39例(65.00%)。MMP-2在肺癌组的阳性表达率显著性高于对照组($P<0.05$)。有研究显示^[10],NSCLC组织120例中,在癌旁正常肺组织中MMP-2表达阳性12例(10.0%),肺癌组织中MMP-2表达阳性有82例(68.3%),MMP-2表达在两组间有显著性差异。但是本次研究MMP-2在NSCLC组织中的表达高于上述研究,在正常组织中的表达稍低于上述研究,考虑可能是由于样本的选择有一定的偏倚,另外可能是样本量的局限,需要开展多中心大样本前瞻性实验来进行下一步的深入探索。

本研究结果发现在NSCLC组织中,MMP-2表达与组织学分化、淋巴结转移和临床分期密切相关,但与肿瘤直径没有关系,但是IL-21R与肿瘤直径有一定关系,这一发现与既往学者的研究结果相似^[6,8]。提示IL-21R和MMP-2不仅与NSCLC的发生有关,而且与肿瘤的侵袭、浸润、转移、肿瘤进展以及预后的恶性生物学行为密切相关,尤其是IL-21R还与NSCLC的细胞生长以及肿瘤的扩大有一定的关系,有可能作为预测NSCLC侵袭、转移可能性的一类标志物。有研究报道称缺氧可刺激MMP-2的表达升高,研究结果显示,MMP-2活性与肺癌组织的缺氧情况呈正相关,而其他研究说明结肠癌细胞、胰腺癌细胞中能检测到MMP-2,特别在缺氧环境下,其分泌活性显著性升高。既往研究揭示临床分期I期的MMP-2阳性率为33.3%、同时II期阳性率为52.9%、III期(III A+III B)阳性率为90.5%,但是本次研究显示分别为31.58%、64.71%、87.50%,与既往研究结果有一定的差异^[9-11]。既往研究显示在MMP-2表达在有、无淋巴结转移的患者中阳性率分别为76.5%、37.5%,而本次研究发现分别为87.80%和36.84%,在NSCLC中MMP-2的表达水平与有无淋巴结转移与临床分期情况有关,MMP-2水平与年龄、性别、吸烟史无显著性相关,这一结果与既往研究报道结果基本符合^[8]。随访结果表明,1年内死亡组IL-21R阳性表达率为81.82%,存活3

年组为 66.67%, 5 年以上存活组为 33.33%; MMP-2 阳性表达率则分别为 90.91%、83.33% 和 33.33%。NSCLC 术后仅存活 1 年和存活 3 年者, 其 IL-21R 和 MMP-2 蛋白阳性表达率显著性高于 5 年或 5 年以上存活者 ($P < 0.01$)。多因素分析显示治疗前 IL-21R 和 MMP-2 高水平表达、淋巴结转移、组织学分化、临床分期是 NSCLC 患者的独立预后因素, 与戚胜波、覃建颖等^[11,12]研究结果一致。因此临床可考虑将 IL-21R、MMP-2 水平作为肺癌预后的客观指标。

MMP-2 的作用为降解细胞外基质、调节细胞迁移, 组成基底膜的主要成分 IV 型胶原, 进而促进血管生成以及肿瘤的生长, 参与分解蛋白成分从而降解细胞外基质, 同时参与到肿瘤细胞降解细胞外基质, 这样促进了转移蛋白水解酶, 从而导致恶性肿瘤侵袭的发生^[5]。MMP-2 一方面导致破坏正常细胞的组织学屏障, 同时也激发了恶性肿瘤的浸润转移, 说明在恶性肿瘤进展迁移过程中 MMP-2 作用较大。本次研究发现 NSCLC 组织 60 例中, IL-21R 表达与 MMP-2 的表达均为阳性 16 例, 均为阴性 21 例。IL-21R 表达与 MMP-2 的表达呈负相关 ($r = -0.478$, $P < 0.05$), 这一发现与既往研究者的研究结果相似^[13]。同样有研究表明^[13]IL-21 参与结合 IL-21R, 之后可以加快 MMP-2 的活化, 说明 IL-21R 在肿瘤发生进展进程中起到一定的作用, 对 NSCLC 的 MMP-2 的表达有一定的影响, 需要进一步深入研究。

综上所述, IL-21R、MMP-2 在 NSCLC 的表达与肿瘤分化和转移有着密切关系, 需要进一步的大样本队列研究和动态监测。

参考文献:

- [1] Qin W, Wang ZB. Distribution of helper T cells 17 and regulatory T cells in non-small cell lung cancer and their relationship with tumor progression [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2016, 33 (8): 1913–1916. [秦伟, 王志斌. 辅助性 T 细胞 17 和调节性 T 细胞在非小细胞型肺癌中的分布及其与肿瘤进展的关系 [J]. 中华实验外科杂志, 2016, 33(8): 1913–1916.]
- [2] Kesselring R, Jauch D, Fichtner-Feigl S. Interleukin 21 impair tumor immunosurveillance of colitis-associated colorectal cancer [J]. Oncoimmunology, 2012, 1(4): 537–538.
- [3] Ryu JG, Lee J, Kim EK, et al. Treatment of IL-21R-Fc control autoimmune arthritis via suppression of STAT3 signal pathway mediated regulation of the Th17/Treg balance and plasma B cells [J]. Immunology Letters, 2015, 163(2): 143–150.
- [4] Moesgaard SG, Aupperle H, Rajamäki MM, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs), tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) and transforming growth factor- β (TGF- β) in advanced canine myxomatous mitral valve disease [J]. Research in Veterinary Science, 2014, 97(3): 560–567.
- [5] Jung O, Lee J, Yu JL, et al. Timosaponin A III inhibits migration and invasion of A549 human non-small-cell lung cancer cells via attenuations of MMP-2 and MMP-9 by inhibitions of ERK1/2, Src/FAK and β -catenin signaling pathways [J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(16): 3963–3967.
- [6] Kaltenmeier C, Gawanbacht A, Beyer T, et al. CD4 + T cell-derived IL-21 and deprivation of CD40 signaling favor the in vivo development of granzyme B-expressing regulatory B cells in HIV patients [J]. Journal of Immunology, 2015, 194(8): 3768–3777.
- [7] Zhu YJ, Lai XL, Zhao S, et al. Establishment of tumor model with B16-F10 melanoma in CB6F1 mice [J]. Cancer Research and Clinical, 2015, 27 (5): 316–319. [朱莺娇, 赖晓兰, 赵坤, 等. CB6F1 小鼠黑色素瘤 B16-F10 细胞移植瘤模型的建立 [J]. 肿瘤研究与临床, 2015, 27(5): 316–319.]
- [8] Willis AL, Sabeh F, Li XY, et al. Extracellular matrix determinants and the regulation of cancer cell invasion stratagems [J]. J Microsc, 2013, 251(3): 250–260.
- [9] Deng BP, Liao M, Qiu RM, et al. Effects of hypoxia on the expression of HIF-1 α , GLUT-1 and MMP-2 in laryngeal carcinoma Hep-2 cells [J]. Cancer Research on Prevention and Treatment, 2016, 63 (8): 663–667. [邓碧凡, 廖敏, 邱荣敏, 等. 缺氧对喉癌 Hep-2 细胞 HIF-1 α , GLUT-1、MMP-2 表达的影响 [J]. 肿瘤防治研究, 2016, 63(8): 663–667.]
- [10] Duijnhoven SMJV, Robillard MS, Nicolay K, et al. In vivo, biodistribution of radiolabeled MMP-2/9 activatable cell-penetrating peptide probes in tumor-bearing mice [J]. Contrast Media & Molecular Imaging, 2015, 10(1): 59–66.
- [11] Qi SB, Yu Q. Expression and correlation of IL-21R and MMP-2 in non-small cell lung cancer [J]. Journal of Clinical Pulmonary Medicine, 2014, 19 (12): 2232–2235. [戚胜波, 于奇. IL-21R、MMP-2 在非小细胞肺癌中的表达及相关性研究 [J]. 临床肺科杂志, 2014, 19(12): 2232–2235.]
- [12] Qin JY. Changes and interactions of IL-21 and TCL cells in peripheral blood and foci of patients with non-small cell lung cancer [D]. Nanning: Guangxi Medical University, 2015. [覃建颖. IL-21 和 TCL 细胞在非小细胞肺癌患者外周血及癌灶中的变化及相互作用 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2015.]
- [13] Lee Y, Mitsdoerffer M, Xiao S, et al. IL-21R signaling is critical for induction of spontaneous experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Journal of Clinical Investigation, 2015, 125(11): 4011–4120.