

食管鳞状细胞癌中 MMP-10、MMP-13 的表达及意义

Expressions of MMP-10 and MMP-13 in Esophageal Squamous Cell Carcinoma and Their Significance // CHENG Xi, SHEN Yi, HUANG Hai-rong

程 熙^{1,2}, 申 翼², 黄海荣²

(1. 蚌埠医学院研究生部, 233000 安徽 蚌埠;

2. 中国人民解放军南京总医院, 江苏 南京, 210000)

摘 要: [目的] 探讨 MMP-10、MMP-13 在食管鳞状细胞癌(ESCC)中的表达及意义。[方法] 采用免疫组化法(S-P)检测各 86 例 ESCC 组织中 MMP-10、MMP-13 的表达。分析 MMP-10、MMP-13 表达与患者临床病理特征的关系及 MMP-10 表达与 MMP-13 表达的相关性。[结果] 86 例患者中, MMP-10 阳性表达 71 例, MMP-13 阳性表达 56 例。MMP-10、MMP-13 阳性表达均与患者性别、年龄、组织分化程度无关(P 均 >0.05), 与淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤浸润深度有关(P 均 <0.05)。ESCC 组织中 MMP-10 表达与 MMP-13 表达呈正相关($r=0.242, P<0.001$)。[结论] MMP-10、MMP-13 表达在食管鳞癌的生长和侵袭转移过程可能有重要作用。

主题词: 食管肿瘤; 基质金属蛋白酶 10; 基质金属蛋白酶 13

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2018)10-1026-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2018.10.B018

食管癌在世界范围内死亡率较高, 在全部恶性肿瘤中排名居第 6 位。我国食管癌患者中 90% 以上的病理类型为鳞癌。相关研究显示, 基质金属蛋白酶(MMPs) 与肿瘤的发生发展有密切关系^[1], MMP-10 和 MMP-13 同属于基质金属蛋白酶家族成员, 能够降解胞外基质, 在肿瘤的侵袭和转移中发挥重要作用^[2]。目前已发现其在食管癌、肝癌、肺癌等组织中高表达, 并与其潜在恶性程度和肿瘤进展有关^[3-6]。但 MMP-10 和 MMP-13 在食管鳞状细胞癌(ESCC)的生长和侵袭转移过程其特异性表达相关报道甚少。本研究通过检测食管鳞癌组织中 MMP-10、MMP-13 表达水平, 探讨两者在食管鳞癌细胞侵袭转移过程中的作用及意义, 为临床诊疗食管鳞癌提供思路和方法。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取 2014 年 7 月至 2016 年 11 月我院 86 例食管鳞癌初治患者, 行手术切除的食管鳞癌组织。手术切除前均未行化疗及其他免疫治疗, 术后病理回示, 明确诊断为食管鳞状细胞癌。其中, 男性 63 例、

女性 23 例; 年龄 35~75(57.87±9.39)岁; 组织分化程度: 低分化 14 例、中分化 38 例、高分化 34 例; 食管癌国际 TNM 分期(2009 版): I 期 6 例、II 期 51 例、III 期 21 例、IV 期 8 例; 有淋巴结转移 48 例, 无淋巴结转移 38 例; 组织浸润程度: 黏膜层 11 例, 肌层 40 例, 纤维层 35 例。本研究经医院伦理委员会批准, 患者均知情同意。

1.2 方 法

1.2.1 设备及试剂

TES99 石蜡包埋机、BM2135 石蜡切片机(德国 MEDITE 公司)、KD-PIII 生物组织摊片机(浙江省金华市科迪仪器设备有限公司)、Axiovert 200 光学显微镜(德国 ZEISS 公司)、超低温冰箱 700(美国 Thermo Forma 公司)、超净工作台 JK001(安徽无尘净化有限公司)、电热鼓风干燥机 DHG-9003(北京中科环试仪器有限公司)、ASP300S 全封闭自动脱水机(德国 LEICA 公司)、SP 免疫组织化学试剂盒和 3,3'-二氨基(3,3'-diaminobenzidine, DAB)显色试剂盒(美国 Beckman Coulter 公司生产)。

1.2.2 免疫组化法

切片制备法: 染色流程: 标本切片脱蜡水化→甲醇处理切片→水洗、PBS 洗→加血清孵育→PR 单抗放置过夜→PBS 洗→加入 SP 复合物孵育→PBS 洗→链霉卵白素孵育→PBS 洗→DAB-孵育→PBS 洗, 水洗→Harris 苏木素复染→水洗→分化、蓝化、脱水封片。

通讯作者: 申翼, 主任医师, 博士; 南京军区总医院心胸外科, 江苏省南京市中山路 305 号(210000); E-mail: dr.yishen@163.com
收稿日期: 2017-09-06; **修回日期:** 2018-01-02

结果判断:MMP-10、MMP-13 染色阳性为胞浆出现棕黄色颗粒区域,随机取不同高倍视野细胞计数共 1000 个计算阳性率,细胞核中棕黄色颗粒为 MMP-10、MMP-13 阳性染色,观察阳性细胞染色情况和阳性细胞染色率:阳性染色细胞<25%为(阴性表达,阳性染色细胞≥25%为阳性表达^[7]。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 软件处理数据,计数资料以百分比表示,并采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

86 例患者中 MMP-10 阳性表达 71 例,MMP-13 阳性表达 56 例。

2.1 MMP-10、MMP-13 表达与食管鳞癌临床病理特征的关系

食管鳞癌组织 MMP-10、MMP-13 阳性表达均与患者性别、年龄、组织分化程度无关(P 均>0.05),均与淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤浸润程度有关(P 均<0.05)。TNM 分期Ⅲ~Ⅳ期患者 MMP-10、MMP-13 阳

性表达率均显著性高于Ⅰ~Ⅱ期($P<0.05$);肿瘤浸润纤维层患者 MMP-10、MMP-13 阳性表达率明显高于浸润黏膜层者($P<0.05$);有淋巴结转移者 MMP-10、MMP-13 阳性表达率明显高于无淋巴结转移者($P<0.05$)。见 Table 1, Figure 1~2。

分析淋巴结转移、TNM 分期、浸润深度与 MMP-10、MMP-13 的相关性,结果显示 MMP-10 表达与食管鳞癌淋巴结转移呈正相关性($r=0.331, P=0.002$)、与 TNM 分期呈正相关($r=0.263, P=0.015$)、与浸润深度呈正相关($r=0.283, P=0.003$);MMP-13 表达与食管鳞癌淋巴结转移呈正相关($r=0.430, P=0.000$)、与 TNM 分期呈正相关($r=0.316, P=0.003$)、与浸润深度呈正相关($r=0.270, P=0.042$)。见 Table 2。

2.2 MMP-10 与 MMP-13 表达的关系

食管鳞癌组织中 MMP-10 与 MMP-13 表达呈正相关($r=0.242, P<0.001$)。见 Table 3。

3 讨 论

食管癌病理组织学类型分为食管鳞癌和食管腺癌两类,其发病率和死亡率在世界范围内有上升趋势

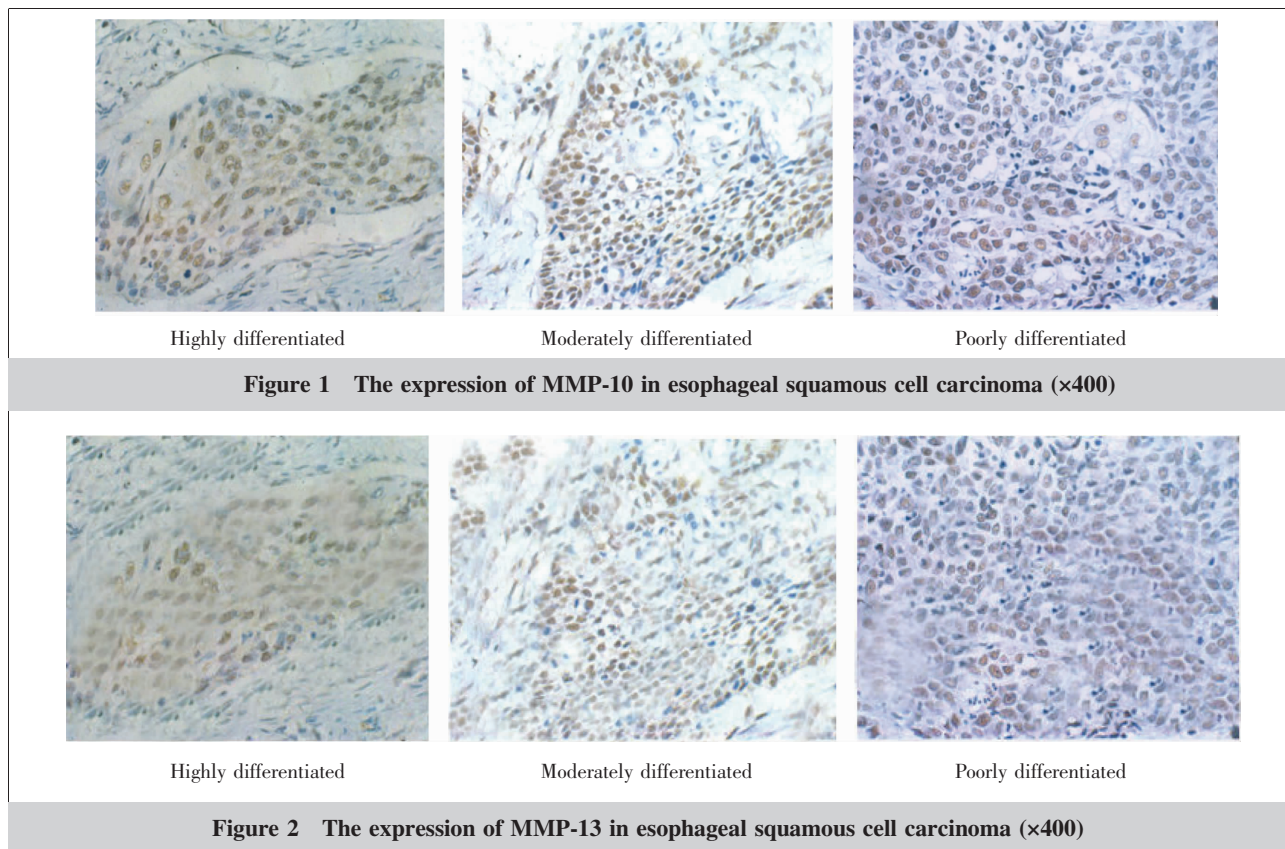


Table 1 The relationship of MMP-10, MMP-13 expression and the clinicopathological features of ESCC

Features	n	MMP-10			MMP-13		
		Positive (%)	χ^2	P	Positive (%)	χ^2	P
Gender							
Male	63	54 (85.71)	1.63	0.20	41 (65.08)	0.00	0.99
Female	23	17 (73.91)			15 (65.22)		
Age (years)							
≥60	50	42 (84.00)	0.17	0.68	32 (64.00)	0.07	0.80
<60	36	29 (80.56)			24 (66.67)		
Degree of tissue differentiation							
High-medium	72	59 (81.94)	0.12	0.73	47 (65.28)	0.01	0.07
Poorly	14	12 (85.71)			9 (64.29)		
Lymph node metastasis							
Yes	48	45 (93.75)	9.45	0.002	40 (83.33)	15.87	<0.001
No	38	26 (68.42)			16 (42.10)		
TNM staging							
I ~ II	57	43 (75.44)	5.95	0.015	31 (54.38)	8.57	0.003
III ~ IV	29	28 (96.55)			25 (86.20)		
Invasion depth							
Mucosal layer	11	6 (54.54)	11.88	0.003	5 (45.45)	6.31	0.042
Muscular	40	31 (77.50)			23 (57.50)		
Fiber layer	35	34 (97.14)			28 (82.86)		

Table 2 Correlation analysis between the degree of tumor malignancy and the expression of MMP-10, MMP-13 in ESCC

Index	MMP-10				MMP-13			
	Positive	Negative	r	P	Positive	Negative	r	P
Lymph node metastasis								
Yes	45	3	0.331	0.002	40	8	0.430	<0.001
No	26	12			16	22		
TNM staging								
I ~ II	43	14	0.263	0.015	31	26	0.316	0.003
III ~ IV	28	1			25	4		
Invasion depth								
Mucosal layer	6	5	0.283	0.003	5	6	0.270	0.042
Muscular	31	9			23	17		
Fiber layer	34	1			28	7		

Table 3 The relationship of MMP-10 and MMP-13 expression in ESCC

MMP-10	MMP-13		r	P
	Negative	Positive		
Negative	14	1	0.242	<0.001
Positive	16	55		

势^[8]。食管癌发生发展侵袭转移机制复杂,涉及到多种发病分子机制的表达。目前临床治疗食管癌以手术为主,但术后复发、易转移,术后5年生存率不超过50%^[9]。

MMP是锌依赖内切酶超家族,可以降解细胞外基质的所有成分,在肿瘤细胞突破ECM和基底膜屏障过程中起促进作用。MMPs是一类由结缔组织

分泌的蛋白水解酶家族,能降解细胞间的基质成分、分解基底膜,MMPs家族的主要生理功能:降解细胞外基质的有效成分、调节细胞黏附、作用于细胞外组分或其他蛋白成分而启动潜在的生物学功能,直接或间接参与胚胎发育、组织再塑及创伤修复等正常生理过程^[9]。因此其高表达与肿瘤的浸润和转移密切相关。研究发现,RKIP可通过负性调控MMP-1、MMP-2、MMP-9、MMP-7等的表达,在抑制肿瘤的侵袭和转移中起了重要作用^[10]。MMP-10与MMP-13同是MMPs家族的重要成员,同属于基质金属蛋白酶家族成员,MMP-13是MMPs家族中的具有降解细胞外基质中的I、II、III、IV型胶原与蛋白多糖的作用,有研究显示^[11],肿瘤的浸润、转移及预

后有关与MMP-13高表达有关。MMP-10是MMP家族中新发现的种类其主要为降解胶原III、胶原IV、明胶、酪蛋白、弹性蛋白等功能。Garcia-Irigoyen等发现MMP-10缺陷小鼠肝癌发生率和肺转移率更低。Justilien等^[12]发现MMP-10维持肺癌干细胞作用,在肿瘤的起始以及转移潜能储备中是必需的。付曦等研究发现MMP-13与肿瘤TNM分期和淋巴结转移密切相关,在TNM分期的表达明显强于分期低者,有淋巴结转移者中的阳性率高于无淋巴结转移者;伊严等^[13]研究发现使用免疫组化SP染色法,结果显示MMP-13阳性表达随肿瘤分级、TNM分期增高和淋巴结转移而增加,差异有统计学意义。胡芳芳等^[14]

也报道,随着肿瘤分级的增高,MMP-13 表达呈现增高趋势。本研究中,食管鳞癌组织 MMP-10、MMP-13 阳性表达均与患者性别、年龄、组织分化程度无关,与淋巴结转移、TNM 分期、肿瘤浸润程度有关 ($P<0.05$)。MMP-10、MMP-13 与淋巴结转移、TNM 分期及浸润深度均呈正相关 ($P<0.05$)。提示 MMP-10、MMP-13 表达越高,食管鳞癌恶性程度越高,两者高表达可能加速肿瘤细胞的侵袭转移。

有研究表明^[15],运用 CCK8 与平板克隆形成实验研究,通过敲降 AJUBA 来检测对食管鳞癌细胞增殖的影响,证明了 AJUBA 过表达促进食管鳞癌细胞的迁移和侵袭。同时使用 RT-PCR 和 Western blot 验证显示,实施敲降 AJUBA 组的细胞中,MMP-10 和 MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达水平均降低,而在过表达 AJUBA 组细胞中,MMP-10 和 MMP-13 的 mRNA 和蛋白表达水平则呈上升趋势,提示 MMP-10 和 MMP-13 的表达水平与 AJUBA 表达水平呈正相关,更进一步证明了 MMP-10、MMP-13 在食管鳞癌细胞的迁移和侵袭过程中起重要作用。

综上所述,MMP-10、MMP-13 在食管鳞癌组织中具有肿瘤特异性表达,临床上检测 MMP-10、MMP-13 在食管鳞癌组织中的表达,可能可为食管鳞癌的诊断及寻找靶向药物治疗提供实验依据。

参考文献:

- [1] Wu Z, Pan XL, Zhong J. Study on the expression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal carcinoma [J]. International Journal of Oncology, 2013, 40 (9): 708-711. [武志, 潘晓玲, 仲洁. MMP-2 和 MMP-9 在食管癌中表达的研究[J]. 国际肿瘤学杂志, 2013, 40(9): 708-711.]
- [2] Zhang J, Jin X, Fang S, et al. The functional SNP in the matrix metalloproteinase-3 promoter modifies susceptibility and lymphatic metastasis in esophageal squamous cell carcinoma but not in gastric cardiac adenocarcinoma [J]. Carcinogenesis, 2004, 25(12): 2519-2524.
- [3] Zhao YF, Xiao CY, Zhang YH, et al. Expression and significance of MMP-10 and RKIP in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Medicine, 2016, 56 (40): 50-52. [赵一帆, 肖春阳, 张瑜红, 等. 食管鳞癌组织 MMP-10、RKIP 表达及意义[J]. 山东医药, 2016, 56(40): 50-52.]
- [4] Tsang RK, Tang WW, Gao W, et al. Curcumin inhibits tongue carcinoma cells migration and invasion through down regulation of matrix metalloproteinase 10 [J]. Cancer Invest, 2012, 30(7): 503-512.
- [5] Li L, Yu S. Effect of MMP-10 on proliferation of hepatoma cells and its molecular mechanism [J]. China Cancer, 2016, 25 (10): 824-829. [李亮, 于双. MMP-10 对肝癌细胞增殖的影响及分子机制研究 [J]. 中国肿瘤, 2016, 25 (10): 824-829.]
- [6] Yang B, Huang J, Xiang T, et al. Chrysin inhibits metastatic potential of human triple-negative breast cancer cells by modulating matrix metalloproteinase-10, epithelial to mesenchymal transition, and PI3K/Akt signaling pathway. [J]. Journal of Applied Toxicology, 2014, 34(1): 105-112.
- [7] Fu X, Li GM, Wen Shi M, et al. Expression and prognostic value of MMP-13 non-small cell lung cancer [J]. Chinese Clinical Oncology, 2012, 17(9): 818-821. [付曦, 文世民, 李光明, 等. MMP-13 在非小细胞肺癌组织中的表达及其预后价值[J]. 临床肿瘤学杂志, 2012, 17(9): 818-821.]
- [8] Xiong WB. The expression and clinical significance of BCAT1 and CD147 in esophageal squamous cell carcinoma [D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2016. [熊威斌. BCAT1 和 CD147 在食管鳞癌中的表达及其临床意义[D]. 广州: 南方医科大学, 2016.]
- [9] Liao Y. Clinical research progress on postoperative radiotherapy and concurrent chemoradiotherapy for esophageal cancer [D]. Suzhou: Soochow University, 2011. [廖洋. 食管癌术后放射治疗及同步放化疗的临床研究进展 [D]. 苏州: 苏州大学, 2011.]
- [10] Ma J, Shi J, Zhao D, et al. Raf kinase inhibitor protein inhibits cholangiocarcinoma cell metastasis by downregulating matrix metalloproteinase 9 and upregulating tissue inhibitor of metalloproteinase 4 expression [J]. Oncol Lett, 2015, 9(1): 15-24.
- [11] Guo MY. Expression of CXCR4 and MMP-13 in laryngeal squamous cell carcinoma and its role in the mechanism of tumor invasion and metastasis [D]. Taiyuan: Shanxi Medical University, 2012. [郭梦媛. CXCR4 和 MMP-13 在喉鳞癌中的表达及其在肿瘤浸润转移机制中的作用[D]. 太原: 山西医科大学, 2012.]
- [12] Justilien V, Regala RP, Tseng IC, et al. Matrix metalloproteinase-10 is required for lung cancer stem cell maintenance, tumor initiation and metastatic potential [J]. PLoS One, 2012, 7(4): e35040.
- [13] Yi Y, Pang ZL. Expression and clinical significance of MMP-13 in non small cell lung cancer [J]. Journal of Basic and Clinical Oncology, 2010, 23(2): 109-111. [伊严, 庞作良. MMP-13 在非小细胞肺癌组织中的表达及临床意义 [J]. 肿瘤基础与临床, 2010, 23(2): 109-111.]
- [14] Hu FF, Hu CL, Ma BL, et al. Expression and significance of MMP-9 and MMP-13 in non-small cell lung cancer [J]. Guangdong Medical Sciences, 2011, 32 (24): 3238-3240. [胡芳芳, 呼彩莲, 马柏林, 等. MMP-9 和 MMP-13 在非小细胞肺癌组织中的表达及意义 [J]. 广东医学, 2011, 32 (24): 3238-3240.]
- [15] Shi XJ. The first part: the expression of AJUBA on the second part to promote the invasion and metastasis of esophageal squamous carcinoma cells through upregulation of MMP10 and MMP13; 5-hmC expression in esophageal squamous cell carcinoma is independent adverse prognostic factors for postoperative [D]. Beijing: Beijing Union Medical College, 2016. [石雪娇. 第一部分: AJUBA 通过上调 MMP10 和 MMP13 表达促进食管鳞癌细胞侵袭转移机制的研究. 第二部分: 5-hmC 表达下调是食管鳞癌独立的术后不良预后因素[D]. 北京: 北京协和医学院, 2016.]