

## 食管癌组织中基质金属蛋白酶-9水平的表达及临床意义

张金添,林扬元,谢群,杨学明

(莆田学院基础医学部,福建 莆田 351100)

**摘要:**目的 探讨食管癌组织中基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase, MMP-9)水平的表达及临床意义。方法 采用免疫组化法检测 MMP-9 在食管癌及癌旁正常食管组织中的表达。Image-pro plus 图像分析软件对其表达强度进行定量分析,并用表达的阳性单位(positive unit, PU)反映其表达强度。**结果** 研究组食管癌组织 MMP-9 水平高于正常食管组织对照组( $P < 0.001$ );不同性别、年龄、病理类型、病变位置食管癌患者 MMP-9 水平间差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),区域淋巴结转移及Ⅲ、Ⅳ期食管癌患者 MMP-9 水平分别高于无淋巴结转移及Ⅰ、Ⅱ期食管癌患者( $P < 0.05$ )。**结论** 食管癌组织中 MMP-9 水平较正常组织异常增高,且随淋巴结转移及临床分期增加,其增高幅度更显著,但与患者年龄、性别及病理类型无关,临床可通过检测食管癌患者组织中 MMP-9 水平判断其病情进展状况。

**关键词:**食管癌;基质金属蛋白酶-9;免疫组化;定量分析

中图分类号:R735.1

文献标识码:A

文章编号:1001-5817(2018)06-0552-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2018.06.011

## Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 in esophageal carcinoma tissues

Zhang Jintian, Lin Yangyuan, Xie Qun, Yang Xueming

(Department of Preclinical Medicine of Putian College, Putian 351100, Fujian, China)

**Abstract:** **Objective** To explore the expressions and clinical significance of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in esophageal carcinoma tissues. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expression of MMP-9 in esophageal carcinoma tissues and adjacent normal esophageal tissues. Image-pro plus image analysis software was used to given quantitative analysis on its expression intensity, and positive unit (PU) of expression was used to reflect its expression intensity. **Results** The expression of MMP-9 in esophageal carcinoma tissues (research group) was higher than that in normal esophageal tissues (control group) ( $P < 0.001$ ). There was no significant difference in the MMP-9 expression in patients with esophageal carcinoma of different genders, ages, pathological types and lesions sites ( $P > 0.05$ ), and the MMP-9 expression in patients with regional lymph node metastasis and stage Ⅲ、Ⅳ esophageal carcinoma was higher than that in patients with no lymph node metastasis and with stage Ⅰ、Ⅱ esophageal carcinoma ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The MMP-9 expression in esophageal carcinoma tissues is abnormally increased compared with that in normal tissues, and its increase is more significant with the increase of lymph node metastasis and clinical stages, but it has no significant correlation with the age, gender and pathological types of patients. The detection of MMP-9 expression in esophageal carcinoma tissues can judge the disease progression in clinical practice.

**Key words:** esophageal carcinoma; matrix metalloproteinase-9; immunohistochemistry; quantitative analysis

食管癌为消化道多发恶性肿瘤疾病,随疾病诊疗技术提高,食管癌综合治疗效果得到显著提升,但术后5年生存率仍仅约25%~40%,研究发现,食管癌患者就诊时多已进展至中晚期,病灶已发生转移及浸润等,故单纯通过手术较难取得满意效果<sup>[1-2]</sup>。食管癌浸润

及转移为多步骤复杂过程,诸多原癌基因激活和抑癌基因失活后,可致使食管上皮细胞增殖及生长、细胞周期、凋亡及分化等调控紊乱,并引起癌变。研究表明<sup>[3]</sup>,肿瘤转移时,首先为癌细胞从原发灶脱落,进入淋巴道或血道,以此形成远处转移,但细胞外基质与基

基金项目:福建省自然科学基金项目(2017J01546)

第一作者简介:张金添(1978-),女,硕士,副教授,研究方向:肿瘤病理学,E-mail:ptblzhang@163.com

底膜降解为其重要前提。肿瘤细胞需具备突破细胞屏障、降解细胞外基质能力,此过程需依靠蛋白水解酶,而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)为锌离子依赖性内肽酶,可降解细胞外基质多数成分,并能于组织塑形及胚胎发育中发挥重要作用。病理状态下, MMPs可降解基质膜及包绕肿瘤的基质,并突破基质屏障,促使肿瘤侵袭与转移,且能通过血管新生及内皮细胞迁移等加速肿瘤生长与扩散<sup>[4-5]</sup>。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)为 MMPs 家族的重要成员,可降解细胞外基质内明胶及弹性纤维,于肿瘤浸润及转移中产生重要作用。基于此,本研究选取 65 例食管癌患者,探讨其 MMP-9 水平的表达及临床意义,现将研究结果报告如下。

## 1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 65 例食管癌组织为研究组,同时取癌旁正常食管组织 20 例为对照组。研究组男 44 例,女 21 例;年龄 43~80 岁,平均(66.98±8.18)岁;病变位置:下段 15 例,中段 38 例,上段 12 例;病理类型:腺鳞癌 8 例,鳞癌 57 例;无淋巴结转移 34 例,区域淋巴结转移 31 例;临床分期:I 期 12 例,II 期 24 例,III 期 20 例,IV 期 9 例。

1.2 选取标准 纳入标准:①研究组经组织病理学确诊为食管癌;②术前未经治疗。排除标准:①合并肾肝功能重度障碍者;②合并血液系统、内分泌系统、自身免疫系统重度病变者;③合并全身性重度感染性疾病者;④发生脑转移者;⑤合并其他恶性肿瘤者。

### 1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学染色 所有标本以 10% 中性甲醛予以固定,脱水、石蜡包埋处理,制为 4 μm 厚切片。石蜡切片脱蜡至水,蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min。抗原修复采用热修复法:锅中加入适量 pH 9.0 的 EDTA 修复液,加热至沸腾,放入切片水煮 20 min。采取 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化物酶 30 min,滴加正常山羊血清封闭 20 min,组织切片加 1:500 抗 MMP-9 特异性抗体(武汉博士德生物工程有限公司),于 4℃ 环境中孵育过夜,第 2 d,经 PBS 漂洗 3 次,滴加经生物素所标记的二抗,于 37℃ 环境中孵育 30 min,以 PBS 洗 3 次,5 分/次,滴加试剂复合物(辣根酶标记生物素+链霉卵白素),于 37℃ 环境中孵育 30 min,以 PBS 洗 3 次,5 分/次,滴加 DAB 显色剂,于室温条件下显色处理,不复染(用于图像定量分析),脱水、透明、封固。每批免疫组化染色均设立阳性和阴性对照,用已知阳性切片作为阳性对照,用 PBS 缓冲液替代一抗作为阴性对照。

1.3.2 显微图像定量分析 根据阴性和阳性对照的显色情况,在确定无假阳性和假阴性的前提下,以细胞

质染成浅黄色、棕黄色或棕褐色为阳性。用 Image-pro plus 图像分析系统,在 40 倍物镜下,每个样本随机选取 10 个视野。每例样本共测试 200 个阳性细胞,用交互式测试方法测试每个阳性细胞的灰度值为 G<sub>β</sub>,同时在相应的切片中测试背景灰度值 G<sub>α</sub>,按下式计算每个阳性细胞的阳性单位值,本图像分析系统中的 G<sub>max</sub> 为 256。取每个样本中 200 个阳性细胞值的均值作为此样本表达的阳性单位值(Positive Unit, PU)。PU 值越大,表达强度越高;反之,表达强度越低。

$$PU = \frac{|G_{\alpha} - G_{\beta}|}{G_{\max}} \times 100$$

1.4 观察指标 ①统计两组 MMP-9 水平。②统计研究组不同情况(性别、年龄、病理类型、淋巴结转移情况、临床分期、病变位置)者 MMP-9 水平。

1.5 统计学方法 通过 SPSS 18.0 对数据进行分析,计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, *P* < 0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 MMP-9 在食管癌中的阳性表达 MMP-9 染色主要在细胞质,染色呈浅黄色、棕黄色、棕褐色为阳性细胞(见图 1)。

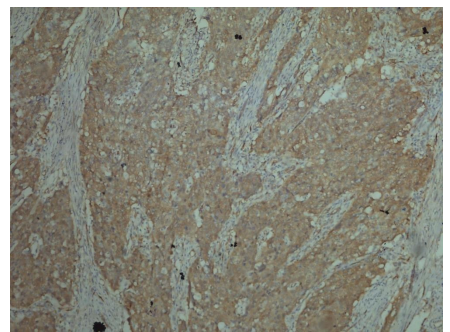


图 1 MMP-9 在食管癌中的阳性表达

2.2 两组 MMP-9 水平比较 研究组 MMP-9 水平高于对照组(*P* < 0.001),见表 1。

表 1 两组 MMP-9 水平比较 ( $\bar{x} \pm s$ , ng/ml)

组别	<i>n</i>	MMP-9(PU 值)
研究组	65	13.88±6.69
对照组	20	6.01±3.73

注: *t* = 6.691, *P* < 0.001

2.3 研究组不同情况者 MMP-9 水平 不同性别、年龄、病理类型、病变位置食管癌患者 MMP-9 水平间差异无统计学意义(*P* > 0.05),区域淋巴结转移患者

MMP-9水平高于无淋巴结转移患者( $P < 0.001$ )。Ⅲ、Ⅳ期食管癌患者MMP-9水平高于Ⅰ、Ⅱ期食管癌患者( $P < 0.05$ ),见表2。

表2 研究组不同情况患者MMP-9水平比较 ( $\bar{x} \pm s, \text{ng/ml}$ )

组别	n	MMP-9	t/F	P
性别			0.462	0.646
男	44	13.62±6.35		
女	21	14.44±7.48		
年龄(岁)			1.155	0.253
≥60	38	14.69±6.57		
<60	27	12.75±6.80		
病理类型			0.158	0.875
腺鳞癌	8	13.84±6.73		
鳞癌	57	14.24±6.82		
淋巴结转移情况			3.624	0.001
无淋巴结转移	34	11.28±6.98		
区域淋巴结转移	31	16.74±5.08		
临床分期			2.355	0.022
Ⅰ、Ⅱ期	36	12.19±6.84		
Ⅲ、Ⅳ期	29	15.98±5.94		
病变位置			0.114	0.892
上段	12	13.95±9.61		
中段	38	13.59±5.78		
下段	15	14.57±6.52		

### 3 讨论

食管癌具有较高发病率,且在不同民族、地区及国家间其发病情况存在明显差异性,相关统计资料表明,食管癌发病率在恶性肿瘤中高居第5位,世界范围内每年新增病例多达46万左右<sup>[6]</sup>。我国为食管癌多发地区,对患者身心健康及生活质量均造成了巨大威胁,及早确诊并采取有效治疗方案对患者实施干预,对保证治疗效果、改善预后具有重要意义,为此,本研究尝试探讨MMP-9水平和食管癌及其转移、临床分期等生物学相关性,以期寻找一种和食管癌病情具有相关性的指标,从而为疾病诊断、疗效及预后评估等提供一定依据。以往对食管癌中MMP-9表达的研究多为半定量或定性观察,带有一定主观性,本研究采用图像分析方法对食管癌MMP-9表达进行原位定量研究可以更客观准确反映其表达水平,从量化角度揭示其与食管癌临床病理特征的关系。

多数食管癌确诊时疾病已进展至中晚期,生存期限较短,且预后较差,主要原因在于病灶多已发生浸润转移。食管癌病灶转移首先是癌细胞自原发病灶脱离,经浸润到达周边间质内生长,并和局部毛细血管及淋巴管内皮细胞接触、穿透管壁,或进入管腔并转运至靶组织,穿透淋巴管或毛细血管,于基质中增殖,产生新继发肿瘤。研究发现<sup>[7-8]</sup>,食管癌浸润转移涉及肿瘤细胞和正常组织基质细胞间相互作用、肿瘤细胞和细

胞外基质成分间细胞与基质互相作用,此作用可激活及释放多种生长因子及细胞因子,此类因子能间接或直接刺激肿瘤生长,也可直接促使肿瘤细胞持续增殖。此外,蛋白质水解酶在食管癌侵袭转移调控中具有重要作用,特别是细胞外蛋白质水解酶,其直接参与肿瘤细胞和周边基质细胞、基质成分间酶解作用,协助肿瘤细胞透过基底膜,损坏其固有平衡,以此造成肿瘤细胞恶化,且Ohashi K等<sup>[9]</sup>研究已证实MMPs在食管癌上述病理过程中具有重要作用,并与肿瘤转移、生长等具有正相关关系。

MMP-9为临床发现的可降解Ⅳ型胶原的重要机制蛋白水解酶,可损坏基质降解平衡,促使癌细胞透过基底膜和细胞外基质所形成的屏障,以此对周边组织产生侵袭作用,并转移至远处组织,于食管癌侵袭及转移中具有重要作用<sup>[10]</sup>。本研究结果表明,研究组MMP-9水平高于对照组,且区域淋巴结转移及Ⅲ、Ⅳ期食管癌患者MMP-9水平分别高于无淋巴结转移及Ⅰ、Ⅱ期食管癌患者( $P < 0.05$ ),表明食管癌患者MMP-9水平异常增高,且可能于疾病进展及病灶转移等过程中发挥了重要作用。正常生理状态下,机体组织中MMP-9含量较低,若机体需要,其相关信息可转导至细胞,经细胞内转录调控,合成、分泌MMP-9,其于机体中调控包括基因水平调节、基质金属蛋白酶组织抑制剂调节、酶原活化调节等,但若此类调节失控,则会造成肿瘤细胞浸润与转移<sup>[11]</sup>。此外,Klimczak-bitner AA等<sup>[12]</sup>研究表明,细胞外基质中,MMP-9活性可经内源性抑制剂-金属蛋白酶组织抑制因子(TIMPs)家族调控,金属蛋白酶组织抑制因子对MMP-9抑制作用表现为2个方面,分别为:①抑制已活化基质金属蛋白酶活性;②阻止基质金属蛋白酶原活化。正常机体中,MMPs和TIMP协同生成,可维持动态平衡状态,但若该平衡被打破,则细胞外基质代谢可出现明显异常,进而可造成食管癌发病,并促使疾病进展。另有研究指出<sup>[13]</sup>,肿瘤形成为肿瘤血管形成等因素共同作用过程,疾病进展与新生血管生长密切相关,血管生成过程中,内皮细胞需穿过细胞外基质及基质外细胞架,但内皮细胞仅可穿透已发生降解的细胞外基质及基质外纤维支架,细胞外基质降解依赖组织蛋白酶与MMPs、纤溶酶原/纤溶酶系统作用,主要为MMPs作用,而MMP-9可降解细胞外基质成分及纤维支架,致使疾病进展。

综上所述,食管癌组织中MMP-9水平较正常水准异常增高,且随淋巴结转移及临床分期增加,其增高幅度更显著,但与患者年龄、性别及疾病病理类型无关,临床可通过检测食管癌患者组织中MMP-9水平判断其病情进展状况。

(下转第558页)

学,2016,22(5):766-768.

- [8] Sablotzki A, Mühling J, Czeslick E. Sepsis and multiple organ failure-update of current therapeutic concepts [J]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 2005, 40(9):511-520.
- [9] 孙烈, 胡文志. 利钠肽对心血管系统的作用和调节[J]. *中华医药杂志*, 2004, 4(1):29-32.
- [10] Alexander E, Berezin, Alexander A, et al. The utility of biomarker risk prediction score in patients with chronic heart failure[J]. *Clinical hypertension*, 2015, 22(1):3.
- [11] Palazzuoli A, Beltrami M, Ruocco G, et al. Diagnostic utility of contemporary echo and BNP assessment in patients with acute heart failure during early hospitalization [J]. *European Journal of Internal Medicine*, 2016 (30): 43-48.
- [12] 胡洪波. 测定 N 末端 B 型脑钠肽前体对急性心力衰竭早

期诊断及愈后评估[J]. *中外医学研究*, 2014, 12(2):64-65.

- [13] 伊敏, 么改琦, 郭向阳. 脉搏指示连续心排量监测下脓毒性休克患者心功能变化的前瞻性研究[J]. *中华危重病急救医学*, 2015, 27(1):22-27.
- [14] 黄业清, 谭奕东, 谢桥, 等. 脉搏指示连续心排量监测在急性心肌梗死合并心源性休克治疗中的作用[J]. *安徽医药*, 2018, 22(6):1103-1106.
- [15] 董庆华, 汤展宏, 秦学斌. PICCO 检测在肺心病合并心源性休克中的应用价值分析[J]. *重庆医学*, 2017, 46(23): 3229-3230, 3233.
- [16] 罗金龙, 李树生, 杨光田. 液体平衡状况与感染中毒性休克患者预后的关系[J]. *内科急危重症杂志*, 2008, 14(5): 250-251.

收稿日期:2018-06-22;修回日期:2018-11-05

(上接第 554 页)

#### 参考文献:

- [1] Zhe Qiao, Chengxue Dang, Bin Zhou, et al. Downregulation of O-linked N-acetylglucosamine transferase by RNA interference decreases MMP9 expression in human esophageal cancer cells [J]. *Oncol Lett*, 2016, 11 (5): 3317-3323.
- [2] 朱焕锋, 解鹏, 王洁, 等. 食管癌患者血清血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶 9 的表达及其临床意义[J]. *肿瘤研究与临床*, 2017, 29(3):160-163.
- [3] 熊海科, 朱自江, 陈学忠, 等. MMP-9、TIMP-2 在食管鳞状细胞癌的表达及与术后复发转移和预后的关系[J]. *蚌埠医学院学报*, 2014, 39(7):879-883.
- [4] 张梦曦, 高社干. 基质金属蛋白酶 9 在食管鳞癌中的表达及与生存预后的关系[J]. *国际医药卫生导报*, 2015, 21(14):2001-2004.
- [5] 刘亮, 王莉, 倪晓辰, 等. IκB-α、MMP-9 在食管癌中的表达及其生物学意义[J]. *解放军医药杂志*, 2015, 27(12):32-35.
- [6] Vermeulen E, Zamora-Ros R, Duell EJ, et al. Dietary flavonoid intake and esophageal cancer risk in the European prospective investigation into cancer and nutrition cohort [J]. *Am J Epidemiol*, 2013, 178(4):570-581.

- [7] 胡凯, 韩卫, 丁涤非. E-cadherin 和 MMP-9 在食管癌中的表达及其临床意义[J]. *安徽医学*, 2013, 34(12):1778-1780.
- [8] 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.
- [9] Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas [J]. *Cancer*, 2000, 88(10): 2201-2209.
- [10] 赵国军, 黄俊星. PEDF、CCR7 和 MMP9 在食管癌中的研究进展[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(8):1951-1954.
- [11] 杨景先, 杨卓涛, 黄杰雄, 等. 血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9 在食管鳞癌中的表达及意义[J]. *广东医学*, 2015, 36(10):1556-1558.
- [12] Klimczakbitner AA, Kordek R, Bitner J, et al. Expression of MMP9, SERPINE1 and miR-134 as prognostic factors in esophageal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(5):4133-4138.
- [13] 王侦伟, 杨景先, 陈晓峰. VEGF、MMP-9 在食管癌中的表达与相关因素分析研究[J]. *白求恩医学杂志*, 2016, 14(4):497-498.

收稿日期:2018-11-21;修回日期:2018-11-28