

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)22-2060-03

PCNA 和 MMP9 在宫颈癌组织中的表达与意义

孙红, 王浩, 秦天洁, 阮之平, 马瑾璐 (西安交通大学第一附属医院肿瘤内科 陕西 西安 710061)

Expressions and significance of PCNA and MMP9 in cervix cancer tissue

SUN Hong, WANG Hao, QIN Tian-Jie, RUAN Zhi-Ping, MA Jin-Lu

Department of Oncology, First Affiliated Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China

【Abstract】 AIM: To investigate the expressions of PCNA and MMP9 in cervix cancer tissue and their significance. **METHODS:** The immunohistochemical SP staining method was used to evaluate the PCNA and MMP9 expressions in 46 cases of cervix cancer tissues and 10 cases of normal cervix tissues. **RESULTS:** The expression of PCNA in cervix cancer tissues was much higher than that in normal cervix tissues ($P=0.000$); The positive rate of MMP9 protein 82.61% in 46 cases of cervix cancer was significantly higher than that in 10 cases of normal cervix (30%, $P < 0.05$). There was a positive correlation between PCNA and MMP9 expressions ($r_s = 0.433$, $P = 0.003$). The expressions of PCNA and MMP9 were correlated with the clinical stage ($P < 0.05$), but not with age, pathological stage or growth pattern ($P > 0.05$). **CONCLUSION:** The over-expression of MMP9 has a close relationship with the cell proliferation index in cervix cancer, suggesting that MMP9 may play an important role in the development of cervix cancer.

【Keywords】 cervix neoplasms; proliferating cell nuclear antigen (PCNA); gelatinase B; immunohistochemistry

【摘要】目的:探讨 PCNA, MMP9 在宫颈癌组织中的表达及临床意义。方法:用免疫组织化学 SP 法检测 46 例宫颈癌及 10 例正常宫颈中 PCNA 和 MMP9 的表达,分析不同组织中 PCNA 和 MMP9 表达的差异及两者的相关性。结果:宫颈癌组织 PCNA 的表达明显高于正常宫颈组织($P=0.000$) 38 例宫颈癌的 MMP9 阳性表达(82.61%)明显高于 10 例正常宫颈组织的表达(30%, $P < 0.05$)。PCNA 的表达与 MMP9 的表达呈正相关($r_s = 0.433$, $P = 0.003$)且 PCNA 和 MMP9 均与临床分期有关($P < 0.05$)而与年龄、病例分级及生长方式无关($P > 0.05$)。结论:MMP9 在宫颈癌组织中表达异常增高,与细胞增殖关系密切,提示其对宫颈癌的发展起重要作用。

收稿日期 2006-07-10; 接受日期:2006-08-24

作者简介 孙红, 硕士, 副主任医师。Tel: (029) 85324136 Email: araa@sohu.com

【关键词】 宫颈肿瘤; 增殖细胞核抗原; 明胶酶 B; 免疫组织化学

【中图分类号】 R737.33 **【文献标识码】** A

0 引言

宫颈癌是最常见的女性生殖系统肿瘤,其局部侵袭力强,易直接蔓延和经过淋巴道转移。从原位癌增殖到侵袭转移癌的演进过程,一方面依赖于肿瘤细胞本身的恶性潜能,另一方面是其实质与间质之间相互作用的结果。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)是 DNA 聚合酶的辅助因子,能反映细胞增殖活性。基质金属蛋白酶 9(matrix metalloproteinases 9, MMP9)属于基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)家族成员,能降解 I, IV, V 型胶原及纤维粘连蛋白等基底膜和细胞外基质成分,从而促进恶性肿瘤的浸润、转移及间质血管新生;而间质血管新生则为肿瘤组织提供营养并排出其废物,使肿瘤得以持续迅速生长和发生浸润转移。为进一步探讨宫颈癌发生、发展的机理,我们应用免疫组织化学 SP 法检测不同宫颈组织中 MMP9 和 PCNA 基因的表达,并讨论其临床意义。

1 对象和方法

1.1 对象 2005-01/2006-02 收治经病理确诊的活检标本,年龄 27~70(平均 48.6)岁。46 例宫颈癌浸润癌按国际妇产科联盟(FIGO, 1995)修订的宫颈癌临床分期标准,II 期 28 例(60.9%),III 期 18 例(39.1%)。按 WHO 病理分级标准分级:G16 例(13.0%);G228 例(60.9%);G312 例(26.1%)。高、中、低分化相当于病理分级 1~3 级。常规 40 g/L 甲醛固定、石蜡包埋,切片厚 4~5 μm 。以 10 例正常宫颈组织作对照。

1.2 方法 鼠抗人 MMP9 抗体、小鼠抗大鼠 PCNA 抗体及通用型 SP 9000 试剂盒,山羊血清,生物素标记的二抗,抗辣根过氧化物酶标记的链霉素抗生素,二氨基联苯胺显色液购自武汉博士德生物技术有限公司产品。一抗稀释度均为 1:30。MMP9 和 PCNA 的免疫组织化学染色法按说明书进行操作,采用链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶免疫染色(SP)法进行免疫

组织化学染色,切片常规脱蜡水化后,于柠檬酸缓冲液中煮沸 10 min,保温 10 min 作抗原修复,PBS 冲洗后山羊血清工作液孵育,滴加一抗 37℃ 孵育 2 h, PBS 冲洗 3 次,滴加二抗,PBS 冲洗 3 次,滴加三抗,孵育,PBS 冲洗 3 次,DAB 显色,复染、脱水、透明、封片后镜下观察。一抗以 PBS 为阴性对照。

PCNA 以胞核出现棕黄色颗粒或棕褐色颗粒为阳性细胞,对每例切片进行细胞计数,随机取 10 个视野,记阳性细胞总数,用标记指数 LI 表示,即 $LI(\%) = (\text{阳性细胞数}/\text{计数细胞}) \times 100$,取平均值定义为肿瘤的 PCNA 的 LI^[3]。MMP9 蛋白定位于细胞质,阳性结果以胞质内出现黄色为准。结果判定采用半定量积分法^[4],并根据每张切片的阳性细胞比例及着色深浅计分,着色细胞比例 1p3 以下为 1 分,1p3 ~ 2p3 为 2 分,2p3 以上为 3 分。着色深度:无着色为 0 分;浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。根据两者的乘积判断阳性等级:0 分为(-);1 ~ 2 分为(+);3 ~ 4 分为(++);>4 分为(+++)。

统计学处理:实验结果采用 SPSS13.0 统计软件包进行统计学分析,各指标间的相关采用 Spearman 相关分析法,两组间均数比较采用 *t* 检验,两组间表达率比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCNA 蛋白表达 PCNA 免疫组化阳性细胞为胞核着色,46 例宫颈组织中均有不同程度 PCNA 的阳性表达,PCNA 标记指数为 4.00% ~ 71.06%,在中、晚期恶性肿瘤组织中 PCNA 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$),分化程度越差,PCNA 表达越高,但没有统计学差异。而 PCNA 的表达与年龄、生长方式无明显相关性。正常宫颈组织见 PCNA 极微弱阳性染色,10 例正常组织 PCNA 标记指数不足 5% (表 1)。

2.2 MMP9 蛋白表达 MMP9 免疫组化阳性的表达主要位于细胞的胞质和细胞膜,肿瘤细胞间质均呈均质性的弱阳性反应。MMP9 阳性的癌细胞均呈灶状或片状分布,且多位于癌边缘。宫颈癌组织多呈阳性、中度阳性表达。正常宫颈组织 MMP9 表达多为阴性或弱阳性。MMP9 在宫颈癌的表达率为 82.61%,不同年龄组中的表达分别为 87.50% (<49 岁),72.72% (≥ 49 岁);在中、晚期患者中的表达分别为 71.42% 和 100.00%,在低分化及中高分化的表达分别为 83.33% 82.35%,在菜花型和结节型生长方式中的表达分别为 93.75% 57.14%,其中在中、晚期

患者中的表达有统计学意义($P < 0.05$),与其余各项临床病理参数均无统计学意义。46 例宫颈癌组织中两者表达阳性者 38 例(82.61%),呈正相关($r_s = 0.433, P = 0.003$)。

表 1 46 例患者 PCNA 和 MMP9 的表达

| 参数 | n | PCNA LI ($\bar{x} \pm s$) | MMP9(n) | | |
|------------------|----|--------------------------------|---------|----|----------|
| | | | - | + | ++ ~ +++ |
| 年龄(岁) | | | | | |
| <49 | 24 | 36.95 \pm 4.73 | 2 | 6 | 16 |
| ≥ 49 | 22 | 28.73 \pm 4.49 | 6 | 8 | 8 |
| 临床分期 | | | | | |
| II | 28 | 22.66 \pm 3.72 | 8 | 8 | 12 |
| III ^a | 18 | 49.13 \pm 3.73 | 0 | 6 | 12 |
| 组织分化程度 | | | | | |
| 低分化 | 12 | 39.82 \pm 6.44 | 2 | 2 | 8 |
| 中、高分化 | 34 | 30.61 \pm 3.80 | 6 | 12 | 16 |
| 生长方式 | | | | | |
| 菜花型 | 32 | 33.05 \pm 3.84 | 3 | 9 | 20 |
| 结节型 | 14 | 32.94 \pm 6.55 | 5 | 5 | 4 |

^a $P < 0.05$ vs II 期。

3 讨论

宫颈癌的发生和发展是多基因、多因素及分子水平多阶段的过程。目前宫颈癌的发病率有上升趋势,尤其年轻宫颈癌发生率上升趋势更加明显^[5]。增殖、浸润和转移是恶性肿瘤主要的生物学特征,也是影响治疗效果和预后的主要因素。

PCNA 是 DNA 聚合酶的辅助因子,属于一种酸性核蛋白,参与 DNA 的合成并在细胞周期中起重要的调控作用。PCNA 在 DNA 的合成的 G1 期开始增加,至 S 期达到高峰,G2/M 期迅速降低。这种变化恰好与细胞增殖周期过程相关。由于 PCNA 的合成与表达和细胞增殖活性密切相关,因此检测 PCNA 可以反映癌细胞 DNA 的合成情况,为癌细胞增殖活性提供客观指标。PCNA 不仅在 DNA 复制中起关键作用,而且许多细胞内外增殖信号都须经过 PCNA 的参与,才能引发细胞 DNA 合成及分裂增殖^[6]。研究发现,PCNA 与许多恶性肿瘤如脑星形细胞瘤、宫颈癌、肝癌、乳腺癌等地病理分级、临床分期及淋巴结或脏器转移有关,并可用于临床诊断、指导治疗以及预后评估。本研究发现宫颈癌患者 PCNALI 与正常宫颈组相比有显著性差异($P < 0.05$),说明宫颈癌细胞有生长调节失控、DNA 合成紊乱现象。细胞的异常增殖对肿瘤的发生发展起了重要作用,而与增殖相关基因的

异常表达恰恰解释了细胞的异常增殖. 本研究中 PCNA 的阳性表达与宫颈癌的浸润深度有关, 分期越晚 PCNA 的表达越高. 这提示宫颈癌一旦浸润转移后, 癌细胞增殖活性大大增加, 恶性程度明显增高. 本研究发现分化程度越低, PCNA 的表达越高, 这与文献报道肿瘤细胞的分化程度越低, 增殖指数增高, 恶性越高相一致, 但本研究未发现具有显著性差异, 可能与病例数较少有关.

基质金属蛋白酶 (MMPs) 活性与肿瘤浸润转移能力之间有着密切的关系. 肿瘤新生血管的形成过程中包括毛细血管内皮下层基底膜降解, 内皮细胞迁移和增殖、新生血管形成和新的基底膜形成等一系列过程^[7]. MMP9 是 MMPs 中分子量最大的酶, 是一类分解细胞外基质组分的锌蛋白酶, 它以酶原的形式分泌, 被激活后形成 IV 型胶原酶. 一方面降解、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质和血管壁的基底膜, 促进肿瘤侵袭和转移, 另一方面则通过毛细血管内生、新生血管生成促进肿瘤侵袭和转移. 基质蛋白酶是高度保守的一类酶, 可以特异降解肿瘤细胞外基质中的一种或几种蛋白质, 故可以降解所有的细胞外基质, 由此 MMPs 降解细胞外基质是肿瘤细胞向瘤灶周围侵袭性生长的关键事件^[8]. 本研究发现在增长正常组织中 MMP9 呈低水平表达或阴性表达, 而在肿瘤组织中呈阳性表达, 且 MMP9 的表达量在两者中有显著差异 ($P < 0.05$).

本研究发现 PCNA, MMP9 在宫颈癌组织中的表达中随着病理分期越高表达指数明显增高. 有关文献报道癌细胞 MMP9 表达增强与其增殖指数的增加有关, MMP9 表达细胞增殖指数明显高于阴性对照组, 提示 MMP9 具有促进细胞增殖功能. PCNA 蛋白检测可直接反映细胞合成代谢及增殖状态. 而 MMP9 基因调控主要在转录水平, 多种 MMP 基因的增强子区域有高度的调控元件的保守性, 由生长因子、细胞因子和环境因素诱导表达. 宫颈癌组织中

MMP9 表达与正常组织相比明显增高, 与细胞增殖关系密切, 提示 MMP9 基因的激活可能通过促进肿瘤细胞增殖, 以及降解细胞外基质和血管壁的基底膜促进肿瘤的发生发展. 可以推测, 两者表达的宫颈癌细胞中 PCNA 促进细胞的大量增殖, 而 MMP9 能够破坏细胞外基质, 提供癌细胞的发展空间和转移通道, 两者相互协同, 可能造成了宫颈癌易复发转移的特征. 针对二者的靶向治疗, 则有可能阻断宫颈癌的进程. 有关 MMP9 与 PCNA 对宫颈癌预后的关系需做进一步随访研究.

【参考文献】

- [1] Fernandez-Sanchez M, Gamboa-Dominguez A, Uribe N, et al. Clinical and pathological predictors of the response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy in locally advanced breast cancer [J]. *Med Oncol*, 2006 23(2): 171-183.
- [2] Rytönen AK, Vaara M, Nethanel T, et al. Distinctive activities of DNA polymerases during human DNA replication [J]. *FEBS J*, 2006 273(13): 2984-3001.
- [3] Nair A, Venkatraman M, Maliekal TT, et al. NF κ B is constitutively activated in high-grade squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the human uterine cervix [J]. *Oncogene*, 2003 22(2): 50-80.
- [4] 牟晓燕, 李怀臣, 韩俊庆. MMP2 和 MMP9 在非小细胞肺癌组织中的表达 [J]. *山东医药*, 2004 44(25): 7-8.
- [5] Parkin DM. Global cancer statistics in the year 2000 [J]. *Lancet Oncol*, 2001 2(9): 533-543.
- [6] Taftachi R, Ayhan A, Ekici S, et al. Proliferating-cell nuclear antigen (PCNA) as an independent prognostic marker in patients after prostatectomy: a comparison of PCNA and Ki-67 [J]. *BJU Int*, 2005 95(4): 650-654.
- [7] Morgan H, Hill PA. Human breast cancer cell-mediated bone collagen degradation requires plasminogen activation and matrix metalloproteinase activity [J]. *Cancer Cell Int*, 2005 5(1): 1-5.
- [8] 何茵芳, 吴智玉, 韩钦玮. 卵巢上皮癌 PTEN 和 PCNA 的表达 [J]. *第四军医大学学报* 2005 26(19): 1808-1810.

编辑 许昌泰