

胃癌组织 CD₄₄v9 和 MMP-2 基因的表达

张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武 军, 梁永信

张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武军, 梁永信, 青岛大学医学院附属医院消化科 山东省青岛市 266003

张翠萍, 女, 1962-12-16 生, 山东省鄄城县人, 汉族, 1983 年青岛医学院本科毕业, 副主任医师, 硕士生导师, 主要从事消化系统疾病的临床研究. 曾获青岛市科技进步二等奖, 山东省卫生厅科技进步一、三等奖.

山东省自然科学基金资助项目, No.1999CA1CKB3

项目负责人: 张翠萍, 266003, 山东省青岛市江苏路 16 号, 青岛大学医学院附属医院消化科. tianzbsun@public.qd.sd.cn

电话: 0532-2911304

收稿日期: 2002-03-20 接受日期: 2002-08-29

Relation between CD₄₄v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer

Cui-Ping Zhang, Zi-Bin Tian, Qing-Xi Zhao, Jun Wu, Yong-Xin Liang

Cui-Ping Zhang, Zi-Bin Tian, Qing-Xi Zhao, Jun Wu, Yong-Xin Liang, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003, Shandong Province, China Supported by the Natural Science Foundation of Shandong Province, No.1999CA1CKB3

Correspondence to: Dr. Cui-Ping Zhang, Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Qingdao University Medical College, Qingdao, 266003, Shandong Province, China. tianzbsun@public.qd.sd.cn

Received: 2002-03-20 Accepted: 2002-08-29

Abstract

AIM: To study the expression of matrix metalloproteinase CD₄₄v9, matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in gastric cancer and the corresponding adjacent normal tissues, to investigate the possible mechanism of tumor invasion and metastasis in gastric cancer.

METHODS: Tumor tissues and adjacent normal tissues in 40 cases of gastric cancer were detected by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) for the expression of CD₄₄v9, MMP-2.

RESULTS: The expression of CD₄₄v9, MMP-2 in tumor tissues were higher than that in adjacent normal tissues, respectively ($\chi^2=12.929$, $\chi^2=10.769$, $P \leq 0.001$). The expression was related to tumor size, degree of differentiation, clinical staging. The expression of CD₄₄v9, MMP-2 mRNA in 17 gastric cancers with lymph node metastasis were higher than that in gastric cancer without lymph node metastasis ($P < 0.05$). The expression of CD₄₄v9, MMP-2 correlated highly with gastric cancer ($r = 0.6$, $P < 0.001$).

CONCLUSION: CD₄₄v9, MMP-2 were related to tumor invasion and metastasis in gastric cancer, and could be used as important indexes to predict invasion and metastasis of gastric cancer.

Zhang CP, Tian ZB, Zhao QX, Wu J, Liang YX. Relation between CD₄₄v9, MMP-2 and tumor invasion and metastasis in gastric cancer. Shijie Huaren Xiaohua Zazhi 2003;11(10):1531-1534

摘要

目的: 研究 CD₄₄v9 和 MMP-2 在胃癌和癌旁组织中的表达, 探讨胃癌侵袭与转移的可能机制.

方法: 采用 RT-PCR 方法分别检测 40 例胃癌及癌旁组织 CD₄₄v9 及 MMP-2 的阳性表达情况.

结果: 40 例胃癌组织中 CD₄₄v9 和 MMP-2 的阳性表达率分别为 75% 和 82.5%, 明显高于癌旁组织的 35% 和 48.5%, 二者比较差异均有显著性 ($\chi^2=12.929$; $\chi^2=10.769$. P 均 ≤ 0.001). CD₄₄v9 和 MMP-2 表达与肿瘤的大小、分化高低、浸润深度及临床分期有关, 合并有淋巴结转移的 17 例胃癌患者 CD₄₄v9 和 MMP-2 表达率明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌患者 ($P < 0.05$), CD₄₄v9 和 MMP-2 的表达与胃癌有相关性 ($r = 0.6$, $P < 0.001$).

结论: CD₄₄v9 和 MMP-2 与胃癌侵袭和转移性有关, 可作为预测肿瘤转移潜能的指标.

张翠萍, 田字彬, 赵清喜, 武军, 梁永信. 胃癌组织 CD₄₄v9 和 MMP-2 基因的表达. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1531-1534

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1531.asp>

0 引言

消化道肿瘤侵袭和转移是肿瘤治疗失败的主要原因, 是多因素综合作用的结果. 已有研究资料表明细胞表面黏附分子 CD₄₄ 能降解细胞外基质蛋白的 IV 型胶原酶 (MMP) 可能在肿瘤的侵袭转移过程中起重要作用^[1-9]. 但有关 CD₄₄v9、MMP-2 联合检测在胃癌发生、转移和预后中的作用及二者相关性的未见报道. 我们采用 RT-PCR 方法观察 CD₄₄v9 和 MMP-2 在胃癌组织和癌旁组织中的表达以及与各临床病理指标之间的关系, 以探讨其阳性表达与胃癌侵袭转移及预后的关系及二者表达的相关性.

1 材料和方法

1.1 材料 胃癌及癌旁组织标本 40 例均取自于本院 2000-06/2001-06 因胃癌行胃大部切除并经病理证实为胃癌的患者. 男 29 例, 女 11 例, 年龄 28-80 (平均 59 ± 13) 岁. 胃窦 17 例, 胃体 11 例, 胃底及贲门 8 例, 残胃及幽门管各 2 例. 高分化 8 例, 中低分化 32 例. 临床早期 9 例, 中晚期 31 例. 有淋巴结转移 17 例, 无淋巴结转移 23 例, 4 例并远处广泛转移. 术中取无菌标本, 放入经消毒处理的小瓶内, -80°C 储存备用. DEPC (焦

碳酸二乙酯) Sigma公司产品; 十二烷基磺酸钠(SDS) BIB 公司产品; TRIZOL 试剂 GIBCO 公司产品. 微量移液器 (法国 Gilson 公司产品); 高速低温台式离心机 3K30 型 (德国); DNA 扩增仪 480 型 (美国 PE 公司产品); 紫外分光光度计(日本岛津公司产品); Ultrascan XL 型激光密度扫描仪 (瑞典 LKB 公司).

1.2 方法 用 D-Hanks 液清洗组织标本, 然后用无菌眼科剪剪碎至直径约 1 mm 组织小块. 加胰蛋白酶和胶原酶消化. 将肿瘤组织和癌旁组织制成单细胞悬液, 用 Trizol 试剂进一步提取细胞总 RNA. 紫外分光光度计定量. CD₄₄v9 和 MMP-2 的检测采用 RT-PCR 方法. 取细胞总 RNA 1 μg, 采用逆转录试剂盒要求的标准条件进行 RNA 逆转录反应, 所获 cDNA 用作 PCR 反应的模板. CD₄₄v9 MMP-2 和内参照 β-actin 基因引物分别参照文献[10]设计, 引物序列如下: CD₄₄v9 引物上游为: 5' - GCA GAG TAA TTC TCA GAG CTT CTC TAC AT-3', 下游为 5' - TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG TTG GAT GG-3', MMP-2 引物上游为: 5' -ACA AAG AGT GGC AGT GCA A-3', 下游为 5' -CAC GAG CAA AGG CAT CC-3', β-actin 引物上游为 5' -CTG TCT GGC GGC ACC ACC AT-3', 下游为 5' -GCA ACT AAG TCA TAG CCG C-3', 上述引物扩增片段长度分别为 302 bp, 365 bp, 476 bp 和 254 bp, 由上海生工技术服务有限公司合成. 对 PCR 反应条件进行优化确定最适浓度和其他各反应成分浓度, 全部实验按最佳优化条件进行, 在同一反应体系对 MMP-2 和 β-actin, CD₄₄v9 和 β-actin 两对基因分别同时扩增, 扩增条件为 95 °C 变性 30 s, 57 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min 共 33 个循环, 最后 72 °C 延伸 2 min. 取扩增产物 10 μL 于含 EB (0.5 mg/L) 的 20 g/L 的琼脂糖凝胶中电泳, 80 V, 1 h, 紫外透射仪下观察结果并照相. 在激光密度扫描仪上扫描底片, 若观察到特异性扩增条带者, 表明 CD₄₄v9 或 MMP 基因阳性表达, 若无特异性扩增条带则视为无 CD₄₄v9 或 MMP 基因表达.

统计学处理 采用 χ^2 及 Spearman 等级相关分析检验.

2 结果

2.1 胃癌组织 CD₄₄v9, MMP-2 的阳性表达 40 例胃癌组织中 CD₄₄v9 和 MMP-2 的阳性表达率分别为 82.5%、75%, 明显高于癌旁组织的 48.5% 和 35%, 二者比较差异均有显著性 ($\chi^2=12.929$; $\chi^2=10.769$. P 均 ≤ 0.001). CD₄₄v9 和 MMP-2 阳性表达率与肿瘤的大小、分化高低、临床分期、浸润深度(MMP-2 除外)及有无淋巴结转移有关, 合并有淋巴结转移的 17 例胃癌患者 CD₄₄v9, MMP-2 表达率明显高于不伴有淋巴结转移的胃癌患者 ($P < 0.05$). 在肿瘤较大、临床分期较晚、浸润较深、及伴有淋巴结转移者, MMP-2 及 CD₄₄v9 阳性表达率明显高于肿瘤较小、临床分期较早、浸润较浅及无淋巴结转移者 ($P < 0.05-0.01$), 表 1.

表 1 胃癌组织 CD₄₄v9 和 MMP-2 与临床病理的关系

临床病理	n	CD ₄₄ v9	MMP-2
肿瘤直径			
大于 5 cm	16	9	10
大于或等于 5 cm	24	21 ^a	23 ^b
分化程度			
高分化	8	3	4
中低分化	32	27 ^b	29 ^b
临床分期			
I、II	15	7	9
III、IV	25	23 ^b	24 ^b
浸润深度			
T ₁ 、T ₂	21	13	15
T ₃ 、T ₄	19	17 ^a	18
淋巴结转移			
有	17	16	17
无	23	14 ^a	16 ^a

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs 同一病理指标相同基因之间的比较.

2.2 CD₄₄v9 与 MMP-2 表达的相关性 有 MMP-2 阳性表达的 33 例胃癌患者组织中 CD₄₄v9 阳性表达者 29 例, 阴性表达者 4 例, 而在 MMP-2 阴性表达的 7 例胃癌患者组织中, CD₄₄v9 阴性表达 6 例. 经 Spearman 等级相关分析检验, 胃癌中 MMP-2 与 CD₄₄v9 表达呈正相关 ($r=0.6$, $P < 0.001$). 在比较胃癌淋巴结转移情况时发现在 MMP-2 和 CD₄₄v9 均阳性表达的 29 例患者中术中发现淋巴结转移 15 例, 淋巴结转移率为 51.7%; 而在 MMP-2 和 CD₄₄v9 均阴性表达的 8 例患者中术中发现淋巴结转移 1 例, 淋巴结转移率为 12.5%, 二者比较有显著性差异 ($\chi^2=3.93$, $P < 0.05$).

3 讨论

本研究表明 CD₄₄v9 在胃癌组织中的阳性表达率显著高于其癌旁组织, 这与其他研究报道结果相一致^[11-15]. 提示 CD₄₄v9 可能与胃癌的发生发展、临床分期及转移有关, 伴有侵袭和转移的胃癌 CD₄₄v9 的表达明显增高, 但与病理类型、肿瘤的大小及组织学类型无明显相关性. 变异型 CD₄₄ 作为一种透明质酸的受体, 分子的 NH₂ 末端功能区能连接细胞外间质及基底膜的透明质酸盐调节细胞的运动和形态, 同时“锚”定在宿主细胞外间质及基底膜上, CD₄₄ 阳性细胞更易与毛细血管后小静脉中的高柱状内皮细胞结合, 使肿瘤细胞更易进入淋巴系统和循环系统, 同时透明质酸降解产物还能启动血管的发生, 为侵袭转移奠定基础, 并且, CD₄₄v9 具有介导淋巴细胞与血管内皮结合, 使淋巴细胞穿过血管壁返回淋巴组织的功能, 所以又称“归巢”受体, CD₄₄v9 可使癌细胞获得转移能力, 通过与远隔血管和淋巴管内某些

配体结合, 使转移至那里的癌细胞更稳定的寄宿, 形成转移癌灶. 这些因素均能使 CD₄₄v9 阳性肿瘤细胞获得更强的侵袭和转移能力.

大量研究显示基质金属蛋白酶尤其是 MMP-2 是细胞外基质成分分解代谢的关键酶, 能降解结缔组织分解细胞外基质(细胞间基质和基底膜)所有的大分子蛋白, 所以他们的活性与肿瘤的侵袭和转移有密切关系^[16-25]. 我们采用先进的 RT-PCR 方法对胃癌及癌旁组织中 MMP-2 进行定性表达, 结果显示, 在胃癌组织中 MMP-2 的阳性表达率均较癌旁组织为高, 有癌旁组织表达的基本见于分化差且临床分期较高的胃癌病例. 分化好或早期胃癌, 癌组织及癌旁组织阳性表达者较少. 从而提示基质金属蛋白酶在胃癌的发生发展中可能起到某些重要的作用, 其活性的阳性检出率可作为胃癌的诊断指标之一. 癌旁组织虽较癌组织中表达率低, 但仍有一定的表达能力, 提示肿瘤细胞可以通过可溶递质或膜黏合分子与间质细胞进行信息交换, 协同产生和调节 MMP, 这在肿瘤细胞侵袭和转移机制中可能具有重大意义.

肿瘤组织中 MMP-2 或 CD₄₄v9 与临床病理因素和预后的关系, 我们发现胃癌组织中 MMP-2 或 CD₄₄v9 的表达与肿瘤的大小有关, 这可能是由于瘤体增大时, 瘤体的血供相对不足, 从而使与癌细胞侵袭相关的功能基因表达增加, 以便逃离血供不足的环境而向远处血供丰富的地方侵犯, 而 MMP-2 是重要的与侵袭相关的功能基因, 因此其表达随着胃癌瘤体的增大而增加^[8]. 这点有助于胃癌的早期诊断及早期治疗. MMP-2 的过度表达与转移性肿瘤细胞的局部浸润和扩散之间具有很密切的关系^[9], 中晚期胃癌 MMP-2 的表达量明显高于早期胃癌, 有淋巴结转移和远处转移者明显高于非转移的胃癌患者, 提示 MMP 系列不仅在胃癌侵袭及转移过程中发挥重要的作用且与胃癌的预后密切相关. 单一 MMP-2 或 CD₄₄v9 与原发肝癌, 乳腺癌、结肠癌等^[26-31]的侵袭和转移性的关系已有报道, 但有关 MMP-2 和 CD₄₄v9 同时与胃癌侵袭和转移性的关系比较研究未见报道, 我们发现 MMP-2 表达与 CD₄₄v9 表达呈正相关, 并且 MMP-2 和 CD₄₄v9 均阳性表达的胃癌患者发生淋巴结转移的可能性大, 尤其当癌组织 MMP-2 表达高于癌旁组织时, 再加 CD₄₄v9 表达明显升高, 提示肿瘤转移. 有人认为肿瘤细胞首先通过已存在的或新形成的结合位点与细胞外基质黏附、结合, 进而溶解细胞外基质, 最后经细胞外基质的缺损处向外侵袭和转移^[32-35].

总之, 到目前为止, 了解肿瘤有无侵袭和转移, 除了手术观察和有无淋巴结及远处转移外, 还没有其他更可靠的预后因子, 因此, 可将 MMP-2 和 CD₄₄v9 作为胃癌侵袭转移性的标志物, 这将为研究使用肿瘤侵袭转移的抑制剂打下理论基础.

4 参考文献

- 1 Wroblewski LE, Pritchard DM, Carter S, Varro A. Gastrin-stimulated gastric epithelial cell invasion: the role and mechanism of increased matrix metalloproteinase 9 expression. *Biochem J* 2002;365(Pt 3):873-879
- 2 Wang C, Tang C. Inhibition of human gastric cancer metastasis by ocreotide in vitro and in vivo. *Zhonghua Yixue Zazhi* 2002;82:19-22
- 3 Kabashima A, Maehara Y, Koga T, Kakeji Y, Sugimachi K. The biologic features of intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Surgery* 2002;131(Suppl 1):S71-77
- 4 Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa K, Chung YS. Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on a lymph node metastatic model of gastric cancer cells passaged by orthotopic implantation. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:213-218
- 5 Yonemura Y, Endo Y, Takino T, Sakamoto K, Bandou E, Kinoshita K, Fushida S, Miwa K, Sasaki T. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase enhances lymph node metastasis of gastric cancer. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:321-327
- 6 Kabashima A, Maehara Y, Kakeji Y, Baba H, Koga T, Sugimachi K. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 2000;6:3581-3584
- 7 Tahara E. Molecular aspects of invasion and metastasis of stomach cancer. *Verh Dtsch Ges Pathol* 2000;84:43-49
- 8 Yamamichi K, Uehara Y, Kitamura N, Nakane Y, Hioki K. Increased expression of CD44v6 mRNA significantly correlates with distant metastasis and poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:256-262
- 9 Xiao CZ, Dai YM, Yu HY, Wang JJ, Ni CR. Relationship between expression of CD44v6 and nm23-H1 and tumor invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 1998;4:412-414
- 10 Hofmann M, Rudy W, Zoller M. CD₄₄ splice variants confer metastatic behavior in rats: Homologous sequences are expressed in human tumor cell line. *Cancer Res* 1991;51:5292
- 11 Koyama S, Maruyama T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:47-54
- 12 Yasui W, Kudo Y, Naka K, Fujimoto J, Ue T, Yokozaki H, Tahara E. Expression of CD44 containing variant exon 9 (CD44v9) in gastric adenomas and adenocarcinomas: relation to the proliferation and progression. *Int J Oncol* 1998;12:1253-1258
- 13 Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer* 1998;79:127-132
- 14 Xin Y, Li XL, Wang YP, Zhang SM, Zheng HC, Wu DY, Zhang YC. Relationship between phenotypes of cell-function differentiation and pathobiological behavior of gastric carcinomas. *World J Gastroenterol* 2001;7:53-59
- 15 李泽民, 樊剑芳, 方建萍. CD44v6 基因变异体在胃癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊 8):21
- 16 Kazuki N, Teruhiko I, Yoshiya S. Front-cells-specific expression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase and gelatinase A during migration of colon carcinoma cells induced by hepatocyte growth factor/scatter factor. *Cancer Res* 2000;60:3364-3369
- 17 Monig SP, Baldus SE, Hennecken JK, Spiecker DB, Grass G, Schneider PM, Thiele J, Dienes HP, Holscher AH. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma. *Histopathology* 2001;39:597-602
- 18 Feng G, Tan Y. Expression and significance of MMP(2) and type IV collagen in gastric cancer. *Zhonghua Waikexue Zazhi* 2000;38:775-777

- 19 Kabashima A, Yao T, Sugimachi K, Tsuneyoshi M. Relationship between biologic behavior and phenotypic expression in intramucosal gastric carcinomas. *Hum Pathol* 2002;33:80-86
- 20 Mizutani K, Kofuji K, Shirouzu K. The significance of MMP-1 and MMP-2 in peritoneal disseminated metastasis of gastric cancer. *Surg Today* 2000;30:614-621
- 21 Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Chang KH. Inhibition of invasion and lymph node metastasis of gastrointestinal cancer cells by R-94138, a matrix metalloproteinase inhibitor. *Anticancer Res* 2000;20:4331-4338
- 22 Chen PS, Zhai WR, Zhou XM, Zhang JS, Zhang YE, Ling YQ, Gu YH. Effects of hypoxia, hyperoxia on the regulation of expression and activity of matrix metalloproteinase-2 in hepatic stellate cells. *World J Gastroenterol* 2001;7:647-651
- 23 Sundblad A, Ricci L. MMP-2 expression (type IV collagenase) in gastric cancer. *Acta Gastroenterol Latinoam* 1998;28:287-290
- 24 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 汪爽, 陈建锋. 二乙基亚硝胺诱发大鼠肝细胞癌发生过程中基质金属蛋白酶动态变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:759-762
- 25 Kohaku K, Shujiro Y, Kiyotsugu Y, Konda Y, Nakajima M, Chiba T, Takahashi R. Activation of fibroblast-derived matrix metalloproteinase-2 by colon-cancer cells in non-contact co-cultures. *Int J Cancer* 2000;87:165-171
- 26 谢玉梅, 聂青和, 周永兴, 程勇前, 康文臻. 地高辛素标记探针原位杂交技术检测肝硬化组织中TIMPs mRNA. *世界华人消化杂志* 2001;9:251-254
- 27 Guo WJ, Li J, Ling WL, Bai YR, Zhang WZ, Cheng YF, Gu WH, Zhuang JY. Influence of hepatic arterial blockage on blood perfusion and VEGF, MMP-1 expression of implanted liver cancer in rats. *World J Gastroenterol* 2002;8:476-479
- 28 Hou L, Li Y, Jia YH, Wang B, Xin Y, Ling MY, Lü S. Molecular mechanism about lymphogenous metastasis of hepatocarcinoma cells in mice. *World J Gastroenterol* 2001;7:532-536
- 29 Jiang YF, Yang ZH, Hu JQ. Recurrence or metastasis of HCC: predictors, early detection and experimental antiangiogenic therapy. *World J Gastroenterol* 2000;6:61-65
- 30 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34的表达与肝癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:170-174
- 31 Yang CQ, Wang JY, Fang JT, Liu JJ, Guo JS. A comparison between intravenous and peritoneal route on liver targeted uptake and expression of plasmid delivered by Glyco-poly-L-lysine. *World J Gastroenterol* 2000;6:508-512
- 32 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 33 Zhang H, Morisaki T, Matsunaga H, Sato N, Uchiyama A, Hashizume K, Nagumo F, Tadano J, Katano M. Protein-bound polysaccharide PSK inhibits tumor invasiveness by down-regulation of TGF-beta1 and MMPs. *Clin Exp Metastasis* 2000;18:343-352
- 34 Spina D, Vindigni C, Presenti L, Schurfeld K, Stumpo M, Tosi P. Cell proliferation, cell death, E-cadherin, metalloproteinase expression and angiogenesis in gastric cancer precursors and early cancer of the intestinal type. *Int J Oncol* 2001;18:1251-1258
- 35 Lee JH, Koh JT, Shin BA, Ahn KY, Roh JH, Kim YJ, Kim KK. Comparative study of angiostatic and anti-invasive gene expressions as prognostic factors in gastric cancer. *Int J Oncol* 2001;18:355-361