

· 论著 ·

MMP-9 和 COX-2 蛋白的表达对胰腺癌预后的影响

贾富鑫 刘江伟 张东 李鹏 李建英 冯玉玲 冯德元

【摘要】 目的 探讨 MMP-9 和 COX-2 蛋白在胰腺癌组织中的表达及其对患者预后的影响。**方法** 应用免疫组化二步法检测 63 例手术切除的原发性胰腺癌组织中 MMP-9 和 COX-2 蛋白的表达情况,分析 MMP-9、COX-2 的阳性表达与患者预后的关系。**结果** (1)MMP-9 和 COX-2 蛋白的阳性表达率分别为 68.3% 和 73%,MMP-9 和 COX-2 蛋白的表达之间有明显相关性($P=0.000$, $r=0.430$)。(2)Kaplan-Meier 法描绘生存曲线分析表明,MMP-9 蛋白阳性组患者中位生存时间(9 个月)明显较阴性组(18 个月)短,差异有统计学意义($P=0.000$);COX-2 蛋白阳性组患者中位生存时间(10 个月)明显较阴性组(36 个月)短,亦有统计学差异($P=0.000$)。MMP-9 阴性/COX-2 阴性组患者(9 例)1 年累计生存率(92.3%)明显高于其他组。(3)Cox 比例风险模型($\chi^2=54.122$, $P=0.000$)多因素分析表明:分化程度($P=0.000$)、淋巴结转移($P=0.000$)、MMP-9 过表达($P=0.000$)及 COX-2 过表达($P=0.024$)为影响胰腺癌预后的独立因素。**结论** 胰腺癌组织中存在 MMP-9、COX-2 的高表达,且两者之间的表达强度具有等级相关性,其高表达提示患者预后不良。联合检测 MMP-9、COX-2 表达可作为预测胰腺癌发生转移的危险性及患者预后情况。

【关键词】 胰腺肿瘤; 基质金属蛋白酶 9; 环氧合酶 2; 免疫组织化学; 预后

Prognostic value of the expressions of MMP-9 and COX-2 in pancreatic carcinoma JIA Fu-xin, LIU Jiang-wei, ZHANG Dong, LI Peng, LI Jian-ying, FENG Yu-ling, FENG De-yuan. Department of Hepatobiliary Surgery, Urumuqi General Hospital of Lanzhou Military Region, Urumuqi 830000, China
Corresponding author: LIU Jiang-wei, Email: ljw273@sohu.com

【Abstract】 Objective To study the expression of MMP-9 and COX-2 in pancreatic cancer cell and its prognostic significance. **Methods** The expressions of MMP-9 and COX-2 were examined in 63 surgical specimens of primary pancreatic carcinoma with immunohistochemistry PV methods, Correlation of these expressions and prognosis of pancreatic cancer was analyzed. **Results** (1) Positive immunostaining for MMP-9 and COX-2 was observed in 68.3% and 73% of the pancreatic cancer samples respectively. The positive expressions of MMP-9 and COX-2 were significantly correlated in pancreatic cancer ($P=0.000$, $r=0.430$). (2) Kaplan-Meier survival analysis showed that The median survival (9 months) of 63 patients with MMP-9(+) was significantly shorter than the median survival (18 months) of the patients with MMP-9(-) (Log-rank test, $\chi^2=32.700$, $P=0.000$). The median survival (10 months) of 63 patients with COX-2(+) was significantly shorter than the median survival (36 months) of the patients with COX-2(-) (Log-rank test, $\chi^2=21.964$, $P=0.000$). 1-year survival (92.3%) of 9 cases with MMP-9(-)/COX-2(-) cases was significantly longer than the median survival of other cases. (3) Cox regression model analysis suggested: The differentiation ($P=0.000$), lymph node metastasis ($P=0.000$), MMP-9(+) expression ($P=0.000$) and COX-2(+) expression ($P=0.024$) were independent prognostic factors for pancreatic cancer. **Conclusions** This study showed that MMP-9 and COX-2 were highly expressed in pancreatic cancer cell, MMP-9 expression was positive correlation with COX-2 expression, which indicated that the overexpression of MMP-9 and COX-2 maybe poor prognostic predictors for pancreatic cancer patients. They

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2011.07.078

基金项目: 中国博士后科学基金第 48 批面上资助项目(20100481517)

作者单位: 830000 兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科(贾富鑫、刘江伟、张东、李鹏、冯玉玲、冯德元), 实验动物中心(李建英)

通讯作者: 刘江伟, Email: ljw273@sohu.com

may be potential indicators of metastasis and predictors for prognosis of pancreatic cancer .

【Key words】 Pancreatic neoplasma; Matrix metalloproteinase 9; Cyclooxygenase 2; Immunohistochemistry; Prognosis

胰腺癌是消化系统常见的恶性肿瘤之一,早期诊断困难,手术切除率低,预后极差,因此对胰腺癌的治疗面临着巨大的挑战。恶性肿瘤治疗失败的主要原因是局部复发和远处转移,而侵袭转移成为影响胰腺癌患者生存期的决定因素。基质金属蛋白酶-9(MMP-9)是一类与肿瘤发生、侵袭和转移密切相关的蛋白水解酶^[1]。研究表明 MMP-9 在多种肿瘤组织中过表达^[2-3]。环氧化酶-2(COX-2)能诱导基质金属蛋白酶产生降解细胞外基质的蛋白酶类,以增强肿瘤细胞的侵袭力^[4]。本研究通过检测胰腺癌组织中 MMP-9、COX-2 的表达,分析胰腺癌组织中 MMP-9、COX-2 的相关性,进而探讨二者在胰腺癌组织侵袭转移中的作用及对患者预后的影响。

资料与方法

1. 一般资料:采用兰州军区乌鲁木齐总医院病理科 2000 年 1 月 1 日至 2007 年 12 月 1 日胰腺癌根治术后存档蜡块 63 例,均经组织病理学诊断为原发性胰腺导管腺癌。其中男 39 例,女 24 例,年龄 28~79 岁,平均 61.1 岁,中位年龄 65 岁。胰头癌 38 例,胰体尾癌 25 例。所有病例术前均未行放疗、化疗,无其他肿瘤史,临床及病理资料完整。采用电话或信函方式对 63 例患者进行了随访,随访时间 3 年,在此期间死于胰腺癌相关疾病者为完全数据,生存和失访病例按截尾数据处理。生存时间按月计算,以手术日至末次随访所得的截尾时间为准。失访 7 例,其中有 2 例术后 3 个月内意外死亡计入失访,失访率 11.1%。

2. 主要试剂及方法:兔抗人 MMP-9 多克隆抗体(ZA-0336),兔抗人 COX-2 单克隆抗体(ZA-0515),均为浓缩液, MMP-9 工作浓度为 1:50, COX-2 工作浓度为 1:15,免疫组化染色试剂盒(PV-9000), DAB 显色液,以上均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。所有标本均经 10% 甲醛固定,常规石蜡包埋,连续 4 μm 厚度常规切片。除作常规 HE 染色外,余做免疫组化染色。步骤严格按照 PV 试剂盒的说明进行。以 PBS 代替一抗作阴性对照,用随试剂所附已知阳性对照片作阳性对照。

3. 结果判定:由两位病理科医师在未知患者临床资料的情况下,独立观察每张切片,每例切片在 400 倍镜下随机选取 5 个视野进行,胰腺癌细胞中 MMP-9 和 COX-2 蛋白的阳性反应物质均呈棕黄色或棕褐色,阳性表达主要定位于细胞质和(或)细胞膜,以切片中染色细胞占细胞总数的 10% 以下为阴性,大于 10% 为阳性^[5]。

4. 统计学处理:所有数据均通过 SPSS 17.0 统计软件进行分析。MMP-9、COX-2 与临床病理因素关系的评估采用 χ^2 检验。MMP-9 与 COX-2 表达的相关性分析应用 Spearman 相关。Kaplan-Meier 法描绘生存曲线和 Log-rank 检验。Cox 比例风险回归模型筛选影响患者预后的独立因素。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

结 果

1. 胰腺癌组织中 MMP-9 和 COX-2 蛋白的表达情况:63 例中有 43 例 MMP-9 蛋白和 46 例 COX-2 蛋白呈阳性表达,阳性率分别为 68.3% 和 73%,见图 1;MMP-9 和 COX-2 蛋白在胰腺癌中的表达呈正相关($P = 0.000, r = 0.430$),见表 1。

2. 胰腺癌组织中 MMP-9 和 COX-2 的表达相关性及其与临床病理指标的关系:二者的表达与肿瘤大小、分化程度、临床分期、远处转移及淋巴结转移均有相关性($P < 0.05$),见表 2。

3. MMP-9 和 COX-2 蛋白的表达与患者生存期的关系:63 例胰腺癌患者的中位生存时间为 11 个月,1 年累计生存率为 39.3%。MMP-9 阳性表达患者 1 年累计生存率为 13.2%,中位生存时间为 9.00 个月, MMP-9 阴性表达患者 1 年累计生存率为 94.4%,中位生存时间 18.00 个月,见图 2A。COX-2 阳性表达患者 1 年累计生存率为 26.7%,中位生存时间为 10.00 个月, COX-2 阴性患者 1 年累计生存率为 90.9%,中位生存时间 36.00 个月,见图 2B。MMP-9 阴性/COX-2 阴性组患者(9 例)1 年累计生存率(92.3%)明显高于其

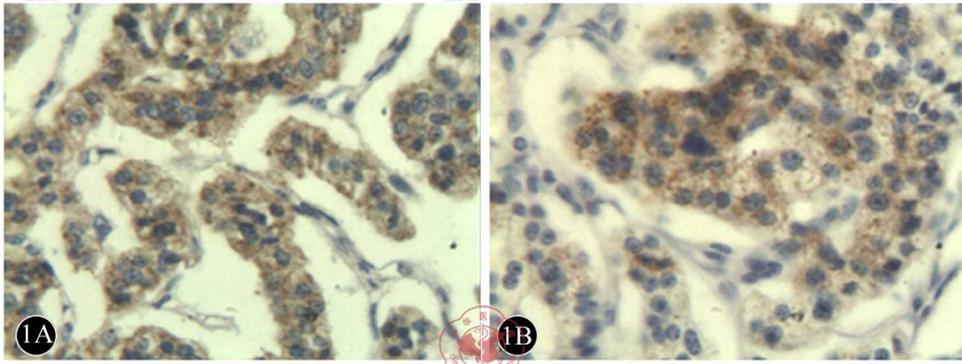


图1 MMP-9 (1A) 和COX-2 (1B) 在胰腺癌组织中的表达 (PV ×400)

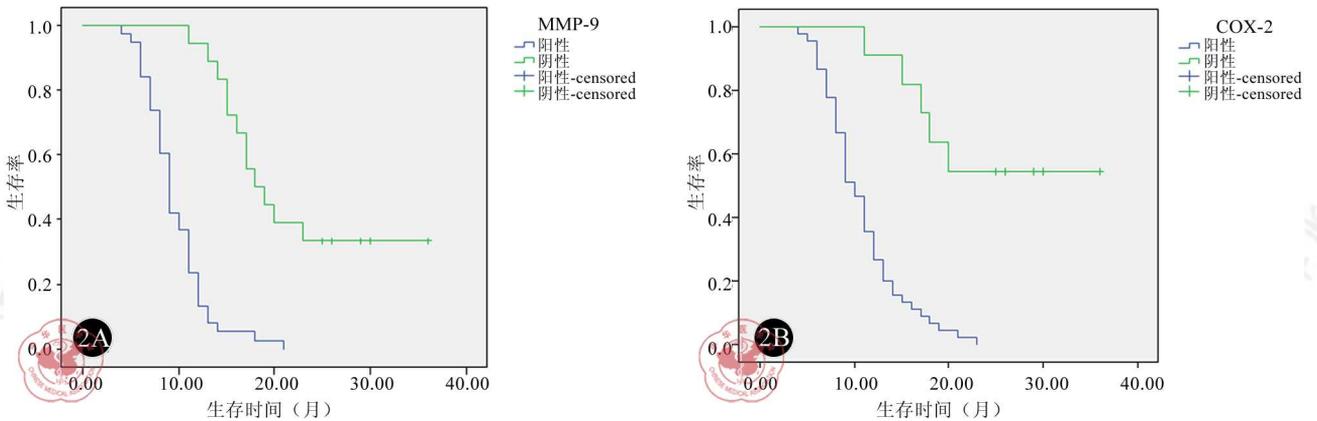


图2 胰腺癌组织中MMP-9 (2A) 和 COX-2 (2B) 表达阳性与阴性组生存曲线

表1 胰腺癌中 MMP-9 与 COX-2 蛋白表达的关系(例)

MMP-9	COX-2		r 值	P 值
	-	+		
-	11	9	0.430	0.000
+	6	37		

他组。生存曲线结果表明：MMP-9 阴性组胰腺癌患者的生存状况也明显好于阳性组患者,差异有统计学意义 (Log-rank 检验, $\chi^2 = 32.70, P = 0.000$); COX-2 阴性组胰腺癌患者的预后明显好于阳性组患者,差异有统计学意义 (Log-rank 检验, $\chi^2 = 21.964, P = 0.000$), 即 MMP-9 及 COX-2 蛋白的过表达与患者生存期的长短均呈负相关。Cox 比例风险模型 ($\chi^2 = 54.122, P = 0.000$) 多因素分析表明:分化程度 ($P = 0.000$)、淋巴结转移 ($P = 0.000$)、MMP-9 过表达 ($P = 0.000$) 及 COX-2 过表达 ($P = 0.024$) 为影响胰腺癌预后的独立因素, 见表3。

讨 论

肿瘤的浸润和转移是肿瘤细胞与肿瘤基质共同参与的结果,其中细胞外基质 (ECM) 的降解是肿瘤细胞突破基质屏障,向周围组织浸润及远处转移的生化基础,在肿瘤的侵袭、转移过程中起重要作用。MMP-9 又名明胶酶-B,是 MMPs 家族成员之一,其可降解、破坏靠近肿瘤表面的基质和基膜,使肿瘤细胞沿着缺失的基膜向周围组织侵袭,并促进肿瘤血管形成,促进肿瘤侵袭和转移。另外,具有转移倾向的癌细胞可自身分泌或诱导其他细胞分泌大量的 MMP-9^[6],使基底膜的完整性遭到破坏,促进肿瘤转移的发生。同时,MMP-9 高表达的肿瘤细胞在侵袭、转移过程中突破各种屏障的能力较强^[7]。MMP-9 在体外实验研究也表明,其可以

表2 MMP-9 和 COX-2 的表达与胰腺癌临床病理因素的关系

临床病理因素	例数	MMP-9 阳性				COX-2 阳性				
		例数	%	χ^2 值	P 值	例数	%	χ^2 值	P 值	
性别	男	39	27	69.2	0.045	0.832	28	71.8	0.077	0.781
	女	24	16	66.7			18	75.0		
年龄	<60 岁	23	18	78.3	1.674	0.196	18	78.3	0.506	0.477
	≥60 岁	40	25	62.5			28	70.0		
肿瘤大小	≤2 cm	4	3	75.0	8.529	0.014	4	100	8.690	0.013
	2~4 cm	41	23	56.1			25	61.0		
	>4 cm	18	17	94.4			17	94.4		
肿瘤部位	胰头部	38	27	71.1	0.346	0.556	26	68.4	1.026	0.311
	体尾部	25	16	64.0			20	80.0		
分化程度	高分化	24	14	58.3	6.469	0.039	11	45.8	14.760	0.001
	中分化	23	14	60.9			20	87.0		
	低分化	16	15	93.8			15	93.8		
TNM 分期	I	8	4	50.0	15.791	0.001	5	62.5	9.687	0.021
	II	15	5	33.3			7	46.7		
	III	24	19	79.2			19	79.2		
	IV	16	15	93.8			15	93.8		
远处转移	有	16	15	93.8	6.434	0.011	15	93.8	4.680	0.031
	无	47	28	59.6			31	66.0		
淋巴转移	有	37	30	81.1	6.808	0.009	31	83.8	5.276	0.022
	无	26	13	50.0			15	57.7		

表3 胰腺癌预后相关因素的 Cox 回归多因素分析

相关因素	B	SE	Wald	df	P 值	Exp(B)	95% CI for Exp(B)
MMP-9	-1.673	0.454	13.593	1	0.000	0.188	0.077 ~ 0.457
COX-2	-1.197	0.530	5.106	1	0.024	0.302	0.107 ~ 0.853
分化程度	1.074	0.285	14.174	1	0.000	2.926	1.673 ~ 5.118
淋巴结转移	0.571	0.163	12.261	1	0.000	1.771	1.286 ~ 2.438

决定多种肿瘤细胞的浸润、转移潜能。高水平的 MMP-9 已经被证实代表了快速增殖和低分化胰腺癌高侵袭性的临床特征^[8-9], 几种胰腺癌细胞株中均报道 MMPs 的激活与肿瘤侵袭力有关^[10-12]。本组 63 例胰腺癌组织中 MMP-9 阳性表达率为 68.3%, MMP-9 阳性表达与肿瘤大小、分化程度、临床分期、远处转移及淋巴结转移关系密切, 表明 MMP-9 在胰腺癌的进展中起一定作用, 其过表达有助于肿瘤细胞侵袭转移, 同时也说明胰腺癌的转移主要与其生物学特征有关。

大量研究表明, MMP-9 在许多恶性肿瘤表达增高, 与肿瘤转移和患者预后密切相关^[13-15]。Rollin 等^[16] 研究证明 MMP-9、MMP-2 与肺癌的浸润、转移、预后相关, 其表达高者易发生转移, 预后差。本组 63 例胰腺癌患者生存分析表明, MMP-9 表达阳性的胰腺癌患者的生存率明显低于 MMP-9 阴性者。经 Cox 风险回归模型分析, MMP-9 蛋白表达水平为影响胰腺癌患者预后的独立因素, 说明 MMP-9 与胰腺癌发生、发展及患者生存期长短密切相关。因此, MMP-9 可作为预测胰腺癌预后的可靠指标。

COX-2 是花生四烯酸合成前列腺素(PGs)的限速酶, 其主要通过抑制细胞凋亡, 抑制抗体免疫功能, 促

进肿瘤组织血管形成及增加肿瘤的侵袭能力而参与肿瘤的发生、浸润和转移。研究认为,COX-2 可能在肿瘤细胞穿越组织自然屏障向远处转移的过程中诱导其产生降解细胞外基质的蛋白酶类,以增强肿瘤细胞的侵袭力。许多研究证实,胰腺癌组织中 COX-2 的表达明显升高^[17-18]。

目前 MMP-9 在胰腺癌中的研究报道较少,有关 MMP-9 和 COX-2 二者在胰腺癌中关系的研究国内外未见文献报道。本研究联合检测 COX-2 及 MMP-9 在胰腺癌中的表达,结果表明 COX-2 与 MMP-9 显著正相关,二者的表达与肿瘤大小、分化程度、临床分期、远处转移及淋巴结转移均有相关性,提示胰腺癌中 COX-2 高表达诱导 MMP-9 表达升高,二者共同参与肿瘤的生长、浸润、转移。目前,已证实 COX-2 与 MMP-9 在肿瘤的发生、发展过程中具有某种内在联系。动物实验显示,特异性的 COX-2 抑制剂 rofecoxib 可使 MMP-9 蛋白水平明显下降,表明 COX-2 可诱导 MMP-9 的产生^[4]。Callejas 等^[19]发现在肝细胞中 COX-2 上调 MMP-2、MMP-9 表达,COX-2 在诱导肝细胞分泌有活性的 MMPs 中发挥了重要作用。其可能的机制是:COX-2 的催化产物 PGE2 通过依赖 PGE2 的途径诱导 MMP-2 和 MMP-9 生成^[20]。Masunaga 等^[21]研究发现,COX-2 可上调 MMPs 表达,降解细胞外基质并上调肿瘤相关血管因子的表达,促进肿瘤血管的形成而增加其侵袭和转移活性,不利于预后。同时,COX-2 可提高细胞与细胞外基质的蛋白黏附能力,激活细胞外 MMPs,促进细胞外基质降解^[22],从而也可促进淋巴结转移。通过以上研究发现并结合本实验研究结果,可以推测:COX-2 与 MMP-9 在胰腺癌的发生、增殖、远处转移中可能发挥了协同作用,共同刺激肿瘤血管形成,进而促进癌浸润与转移;高表达的 COX-2 诱导 MMP-9 表达增加以促进细胞外基质和基底膜的降解,以增强肿瘤细胞的侵袭力,不利于预后;两者协同表达可作为血管生成与肿瘤侵袭转移的标志。

本组 MMP-9 蛋白与 COX-2 蛋白共同表达 37 例,通过 Kaplan-Meier 法描绘生存曲线分析表明, MMP-9 及 COX-2 蛋白的过表达与患者生存期的长短均呈负相关。Cox 回归模型多因素分析结果表明,分化程度、淋巴结转移、MMP-9 过表达及 COX-2 过表达为影响胰腺癌预后的独立因素。因此,检测二者蛋白表达情况可预测胰腺癌发生转移的危险性及患者预后情况,将具有良好的应用前景。

参 考 文 献

- [1] Groblewska M, Mroczko B, Szmítowski M. The role of selected matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer development. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*, 2010, 64:22-30.
- [2] Sampieri CL, de la Peña S, Ochoa-Lara M, et al. Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in human gastric cancer and superficial gastritis. *World J Gastroenterol*, 2010, 16:1500-1505.
- [3] Mroczko B, Łukaszewicz-Zajac M, Guzińska-Ustymowicz K, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in the neoplastic and interstitial inflammatory infiltrate cells in gastric cancer. *Folia Histochem Cytobiol*, 2009, 47:491-496.
- [4] Yao M, Kargman S, Lam EC, et al. Inhibition of cyclooxygenase-2 by rofecoxib attenuates the growth and metastatic potential of colorectal carcinoma in mice. *Cancer Res*, 2003, 63:586-592.
- [5] Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res*, 1998, 58:3761-3764.
- [6] Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, et al. Fibronectin increases matrix metalloproteinase 9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase pathways in human lung carcinoma cells. *J Biol Chem*, 2006, 281:29614-29624.
- [7] Jin JS, Hsieh DS, Lin YF, et al. Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Int J Urol*, 2006, 13:573-580.
- [8] Nagai S, Nakamura M, Yanai K, et al. Gli1 contributes to the invasiveness of pancreatic cancer through matrix metalloproteinase-9 activation. *Cancer Sci*, 2008, 99:1377-1384.
- [9] Uchima Y, Sawada T, Hirakawa K. Action of antiproteases on pancreatic cancer cells. *JOP*, 2007, 8:479-487.
- [10] Ellenrieder V, Hendler SF, Ruhland C, et al. TGF-beta-induced invasiveness of pancreatic cancer cells is mediated by matrix metalloproteinase-2 and the urokinase plasminogen activator system. *Int J Cancer*, 2001, 93:204-211.
- [11] 肖敏, 陈婕, 余晓云, 等. Angiopoietin-2, MMP-9 和 TIMP-1 在胰腺癌中的表达及其与胰腺癌侵袭转移的关系. *临床消化病杂志*, 2006, 18:216-218.
- [12] Tamahashi U, Kumagai J, Takizawa T, et al. Expression and intracellular localization of matrix metalloproteinases in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas. *Virchows Arch*, 2008, 453:79-87.

- [13] Littlepage LE, Sternlicht MD, Rougier N, et al. Matrix metalloproteinases contribute distinct roles in neuroendocrine prostate carcinogenesis, metastasis, and angiogenesis progression. *Cancer Res*, 2010, 70:2224-2234.
- [14] Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, et al. RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis. *Int J Oncol*, 2007, 31:1039-1050.
- [15] 蔡良真, 支梅芬, 何文艳. 鼻咽癌组织 KiSS-1 和 MMP-9 表达与淋巴结转移关系的研究. *中华肿瘤防治杂志*, 2010, 17:495-497.
- [16] Rollin J, Régina S, Vourch P, et al. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2007, 56:273-280.
- [17] 刘江伟, 李开宗, 窦科峰. COX-2 在胰腺癌组织中的表达及其与 p53 的相关性研究. *世界华人消化杂志*, 2003, 11:229-232.
- [18] Juuti A, Louhimo J, Nordling S, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *J Clin Pathol*, 2006, 59:382-386.
- [19] Callejas NA, Casado M, Díaz-Guerra MJ, et al. Expression of cyclooxygenase-2 promotes the release of matrix metalloproteinase-2 and -9 in fetal rat hepatocytes. *Hepatology*, 2001, 33:860-867.
- [20] Cipollone F, Prontera C, Pini B, et al. Overexpression of functionally coupled cyclooxygenase-2 and prostaglandin E synthase in symptomatic atherosclerotic plaques as a basis of prostaglandin E(2)-dependent plaque instability. *Circulation*, 2001, 104:921-927.
- [21] Masunaga R, Kohno H, Dhar DK, et al. Cyclooxygenase-2 expression correlates with tumor neovascularization and prognosis in human colorectal carcinoma patients. *Clin Cancer Res*, 2000, 6:4064-4068.
- [22] Uefuji K, Ichikura T, Mochizuki H. Cyclooxygenase-2 expression is related to prostaglandin biosynthesis and angiogenesis in human gastric cancer. *Clin Cancer Res*, 2000, 6:135-138.

(收稿日期:2010-12-13)

(本文编辑:吴莹)

贾富鑫, 刘江伟, 张东, 等. MMP-9 和 COX-2 蛋白的表达对胰腺癌预后的影响[J/CD]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2011, 5(7):1917-1922.