

肺癌组织中 MMP-9 及 TIMP-1 的表达与转移、预后相关性研究

梁君 刘铭球 谢梅 刘绚

【摘要】 目的 探讨 MMP-9 及其抑制剂 TIMP-1 在人肺癌中的表达及其与肺癌转移、预后的相关性,分析肺癌发生、发展、侵袭和转移的机制。方法 应用免疫组化 S-P 法检测 65 例肺癌、35 例其他肺部疾患病变支气管粘膜增生及不典型增生上皮和 30 例正常支气管粘膜上皮组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的蛋白表达。结果 肺癌与正常、增生上皮相比,增生与正常上皮相比,MMP-9 和 TIMP-1 阳性表达率的升高均具有显著性 ($P < 0.05$)。不同组织学类型中 MMP-9 的阳性表达有显著性差异 ($P < 0.025$);MMP-9 的阳性表达与肺癌细胞分化程度负相关 ($P < 0.05$),与 TNM 分期正相关 ($P < 0.025$)。生存期小于 2 年者的 MMP-9 和 TIMP-1 阳性表达率显著高于生存期大于或等于 2 年者 ($P < 0.05$)。MMP-9 阳性表达上调与肺癌转移相关 ($P < 0.005$),TIMP-1 与转移无关。结论 MMP-9 阳性表达上调可出现在癌前病变及肺癌发病的早期阶段,MMP-9 基因激活可能是肺癌癌变的重要因素;MMP-9、TIMP-1 在肺肿瘤浸润转移中发挥重要作用,其过度表达可作为评估肺癌浸润转移和预后不良的参考指标。

【关键词】 肺肿瘤 免疫组织化学 基质金属蛋白酶类 基质金属蛋白酶组织抑制剂

【中图分类号】 R734.2;R730.231

Expressions of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 and their correlation with metastasis and prognosis in lung cancer LIANG Jun, LIU Mingqiu, XIE Mei, LIU Xuan. Department of Nuclear Medicine, Wuhan University People Hospital, Wuhan, Hubei 430060, P. R. China

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) and their correlation with metastasis and prognosis in human lung cancer. **Methods** Immunohistochemical S-P method was used to detect the expression of MMP-9 and TIMP-1 in 65 lung cancer tissues, 35 hyperplastic and dysplastic epithelium from patients with non-cancerous pulmonary diseases, and 30 normal epithelial tissues of the lung. **Results** The positive expression rates of MMP-9 in normal tissue, hyperplastic or dysplastic epithelium, and lung cancer tissue were 16.7% (5/30), 42.9% (15/35) and 72.3% (47/65) respectively, whereas the positive rates of TIMP-1 expression in normal tissue, hyperplastic or dysplastic epithelium, and lung cancer tissue were 6.7% (2/30), 28.6% (10/35) and 50.8% (33/65) respectively. Significant differences of the expression rates of MMP-9 and TIMP-1 were found between lung cancer and normal groups, between lung cancer and hyperplasia groups, and between hyperplasia and normal groups ($P < 0.05$). Small cell carcinoma and adenocarcinoma had higher MMP-9 expression than squamous cell carcinoma ($P < 0.025$). Expression rate of MMP-9 had negative relation with cell differentiation of lung cancer ($P < 0.05$), and positive relation with TNM stage ($P < 0.025$). Between the survival time <2 years group and ≥2 years groups, both the expressions of MMP-9 and TIMP-1 had significant difference ($P < 0.05$). The expression of MMP-9 was closely related to metastasis of lung cancer ($P < 0.005$), but the expression of TIMP-1 was not related to metastasis. **Conclusion** Overexpression of MMP-9 may appear in precancerous lesion and at the early stage of lung cancer. Activation of MMP-9 gene may be an important factor for oncogenesis of the lung. MMP-9 and TIMP-1 may play important roles in lung cancer invasion and metastasis, their overexpression could act as a reference to evaluate metastasis and unfavourable prognosis of lung cancer.

【Key words】 Lung neoplasms Immunohistochemistry Matrix metalloproteinases Tissue inhibitor of metalloproteinases

This work was supported by a grant from the National Natural Sciences Foundation of China (to LIU Mingqiu) (No. 39870305).

本研究受国家自然科学基金(39870305)资助
作者单位:430060 武汉,武汉大学人民医院核医学科(梁君、谢梅),病理教研室(刘铭球、刘绚)

浸润和转移是肺癌患者死亡的重要原因,也是近年来研究的热点。研究证明,肿瘤细胞向周围和(或)远处组织侵袭和转移,必须穿过细胞外基质(ECM)屏障、血管壁的基底膜(BM),才能进入宿主微循环^[1]。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)是降解 ECM 最为重要的一组蛋白酶,在肿瘤的侵袭和转移中起着重要作用。组织金属蛋白酶抑制物(tissue inhibitor of metalloproteinases, TIMPs)是 MMPs 的天然抑制剂,其表达增强可减少肿瘤的发生、侵袭和转移。在许多侵袭性恶性肿瘤中,其转移组的 MMPs 表达远高于非转移组和正常组织。因此, MMP 可以作为肿瘤侵袭性和转移性的标志^[2]。我们应用免疫组化法,研究 MMP 家族成员中 MMP-9 及其抑制剂 TIMP-1 在肺癌组织中的异常表达,及其与转移预后的关系,以探讨肺癌发生发展、侵袭转移的机制。

1 材料和方法

1.1 资料来源 本研究所用石蜡包埋组织标本来自我院病理科,部分由浙江省温岭市中医院提供。患者均为 1996 年 1 月至 1999 年 12 月的住院患者,在胸外科接受肺肿瘤切除术,术前未作放疗或化疗。其中肺癌患者 65 例(按 WHO1999 年肺癌分类标准分为鳞癌 28 例,腺癌 25 例,小细胞癌 12 例),平均年龄(56.7 ± 3.3)岁, 期 17 例, 期 22 例, A 期 18 例, B 期 8 例。其中 42 例患者有完整的随访资料。

增生和不典型增生支气管粘膜组织 35 例(其中不典型增生上皮仅 8 例,因例数太少与增生上皮归为一组统称为增生组),平均年龄(50.1 ± 3.6)岁,来自其他肺部疾患手术标本;正常支气管粘膜上皮 30 例,平均年龄(58.5 ± 2.5)岁,取自支气管镜活检标本及远离病变组织的正常肺组织标本,均未作过任何治疗。

1.2 方法 包埋组织标本作 3 ~ 5 μm 连续切片备用。对石蜡切片进行免疫组化链霉素抗生物素蛋白-

过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, S-P)法测定。MMP-9 鼠单抗、TIMP-1 鼠单抗、免疫组化 S-P 试剂盒和 DAB 显色试剂均购自福州迈新生物技术开发公司。MMP-9 采用微波修复抗原, TIMP-1 采用高压修复抗原,参照试剂说明书进行免疫组化 S-P 法检测。用已知 MMP-9、TIMP-1 乳腺癌阳性片作阳性对照,在反应中以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判断 在高倍显微镜(10 × 40)下观察细胞着色程度,阳性细胞的胞浆为棕黄色,细胞膜可以有表达,但着色较胞浆浅。高倍镜下取 4 个不同视野各计数 200 个癌细胞,按阳性细胞所占的百分率分为:阴性(-),无阳性细胞;弱阳性(+),阳性细胞 < 30%,呈浅黄色;中度阳性(±),阳性细胞 30% ~ 50%,呈棕黄色;强阳性(≡),阳性细胞 > 50%,呈棕褐色。

1.4 统计学处理 采用²检验和四格表确切概率法。

2 结果

2.1 肺癌组织中 MMP-9 蛋白表达 肺癌组织中 MMP-9 蛋白的阳性表达在高倍镜下呈棕黄色颗粒,主要位于肿瘤细胞的胞浆,多呈中度和强阳性,基质表达较少(图 1、2),阳性表达率为 72.3%(47/65);增生及不典型增生支气管粘膜上皮内 MMP-9 可见弱阳性至中度阳性表达,阳性表达率 42.9%(15/35);正常肺泡上皮和支气管粘膜上皮多呈阴性表达,阳性表达率仅 16.7%(5/30)。与正常上皮、增生及不典型增生上皮相比,肺癌 MMP-9 阳性表达的升高具有显著性($P < 0.01$),增生及不典型增生上皮的阳性表达亦显著高于正常组($P < 0.05$)(表 1)。

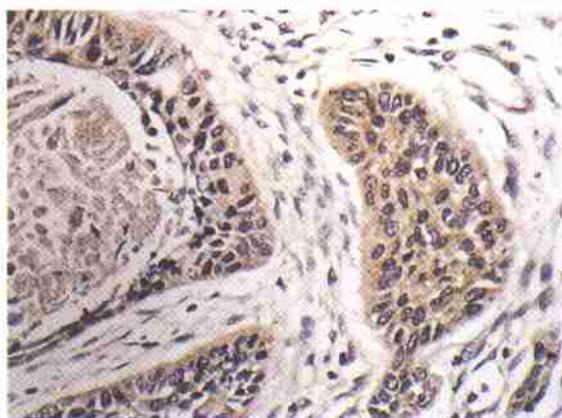


图 1 肺高分化鳞癌癌巢中有较多角化珠、角化囊形成, MMP-9 蛋白呈棕黄色颗粒,主要位于癌细胞胞浆(S-P 法 ×200)

Fig 1 Immunohistochemical staining of MMP-9 protein was seen in the cytoplasm of well differentiated squamous cell carcinoma (S-P method ×200)



图 2 MMP-9 蛋白呈棕褐色颗粒,主要位于高分化腺癌细胞胞浆(S-P 法 ×200)

Fig 2 Immunohistochemical staining of MMP-9 protein was seen in the cytoplasm of well differentiated adenocarcinoma (S-P method ×200)

表 1 肺癌组、增生 + 不典型增生组及正常上皮组中 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达结果

Tab 1 Protein expressions of MMP-9 and TIMP-1 in lung cancer tissue, hyperplastic + dysplastic epithelium and normal epithelium

Group	n	MMP-9			Positive rate	TIMP-1			Positive rate
		+	##	###		+	##	###	
Normal epithelium	30	4	1	0	16.7 %	1	1	0	6.7 %
Hyperplastic + dysplastic epithelium	35	6	8	1	42.9 % *	2	5	3	28.6 % *
Lung cancer tissue	65	6	14	27	72.3 %	18	11	4	50.8 %

Note :compared with lung cancer group , $P < 0.01$, $P < 0.05$;compared between hyperplastic + dysplastic group and normal group , * $P < 0.05$

2.2 肺癌组织中 TIMP-1 蛋白表达 肺癌组织中 TIMP-1 蛋白阳性表达亦主要位于肿瘤细胞的胞浆,以弱阳性和中度阳性为主(图 3),阳性表达率为 50.8 % (33/65);增生及不典型增生的支气管粘膜上皮内可见 TIMP-1 由弱阳性至强阳性表达(图 4),阳性表达率为 28.6 % (10/35);正常上皮阳性表达率仅 6.7 % (2/30)。与正常上皮、增生及不典型增生上皮相比,肺癌 TIMP-1 阳性表达的升高具有显著性 ($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$);增生及不典型增生上皮与正常上皮相比,阳性表达的差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达与临床病理特征的关系 如表 2 所示,肺癌组织中 MMP-9 的阳性表达率与细胞的分化程度呈负相关 ($P < 0.05$),高分化者阳性率低于低分化者 ($P < 0.025$);而 TIMP-1 的表达

与分化程度无关 ($P > 0.25$)。MMP-9 和 TIMP-1 的阳性表达均与肿瘤瘤体大小无关 ($P > 0.25$)。MMP-9 在鳞癌、腺癌、小细胞癌中的阳性表达率差异有显著性 ($P < 0.025$),腺癌、小细胞癌阳性率高于鳞癌 ($P < 0.025$)。TIMP-1 在三种组织类型中的阳性表达率差异无显著性 ($P > 0.25$)。肺癌中 MMP-9 和 TIMP-1 阳性表达率均随着临床 TNM 分期增加而上升,分期越晚表达率越高,各期间 MMP-9 的阳性率差异有显著性 ($P < 0.025$),而 TIMP-1 的阳性率差异无显著性 ($P > 0.10$)。术后生存期小于 2 年者与大于/等于 2 年者相比,MMP-9 和 TIMP-1 的阳性率差异均有显著性 ($P < 0.01$ 及 $P < 0.05$)。MMP-9 的阳性表达与肺癌转移相关 ($P < 0.005$),TIMP-1 与转移不相关 ($P > 0.90$)。

表 2 肺癌组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的阳性表达与患者临床病理特征的关系

Tab 2 Relationship between MMP-9 and TIMP-1 expressions and clinicopathological characteristics of lung cancer patients

Items	N	MMP-9 positive n (%)	χ^2 value	P value	TIMP-1 positive n (%)	χ^2 value	P value
Differentiation			6.05	< 0.05		2.02	> 0.25
Well	25	14 (56.0)			10 (40.0)		
Moderate	22	17 (77.3)			12 (54.5)		
Poor	18	16 (88.9)			11 (61.1)		
Tumor volume			0.89	> 0.25		0.76	> 0.25
3 cm	23	15 (65.2)			10 (43.5)		
> 3 cm	42	32 (76.2)			23 (54.8)		
Histopathology			8.88	< 0.025		2.02	> 0.25
Squamous cell carcinoma	28	15 (53.6)			12 (42.9)		
Adenocarcinoma	25	21 (84.0)			13 (52.0)		
Small cell carcinoma	12	11 (91.7)			8 (66.7)		
TNM stage			11.12	< 0.025		4.55	> 0.10
I	17	8 (47.1)			6 (35.3)		
II	22	15 (68.2)			10 (45.5)		
A	18	16 (88.9)			11 (61.1)		
B	8	8 (100.0)			6 (75.0)		
Survival time			7.09	< 0.01		4.58	< 0.05
< 2 years	24	21 (87.5)			16 (66.7)		
2 years	18	9 (50.0)			6 (33.3)		
Metastasis			8.62	< 0.005		0.01	> 0.90
Without	28	15 (53.6)			14 (50.0)		
With	37	32 (86.6)			19 (51.4)		



图 3 肺低分化鳞癌癌巢不规则或相互连接, 异型性明显、无角化, TIMP-1 蛋白呈棕褐色颗粒, 主要位于癌细胞胞浆内 (S-P 法 $\times 200$)

Fig 3 Immunohistochemical staining of TIMP-1 protein was seen in the cytoplasm of poor differentiated squamous cell carcinoma (S-P method $\times 200$)



图 4 增生支气管粘膜上皮细胞排列出现多层, TIMP-1 蛋白呈棕黄色颗粒, 主要位于上皮细胞胞浆内 (S-P 法 $\times 400$)

Fig 4 Immunohistochemical staining of TIMP-1 protein was seen in the cytoplasm of hyperplastic epithelium (S-P method $\times 400$)

3 讨论

浸润和转移是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。MMPs 在肿瘤浸润和转移中起关键作用。MMP-9 是 MMPs 中分子量最大的酶,它以酶原形式分泌,被激活后形成 型胶原酶,一方面降解、破坏靠近肿瘤表面的 ECM 和 BM,使瘤细胞可沿着缺失的 BM 向周围组织浸润,促进肿瘤侵袭和转移,另一方面则通过毛细血管内生、新生血管生成等促进肿瘤生长和扩散。

本实验中对比研究了 65 例肺癌、35 例增生及不典型增生支气管粘膜上皮以及 30 例正常支气管粘膜组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的表达情况,发现肺癌、增

生及不典型增生支气管粘膜上皮中 MMP-9 阳性表达上调,正常上皮大多呈阴性表达。由正常肺组织增生及非典型增生 肺癌的演进过程中, MMP-9 阳性表达呈上升趋势。肺癌与增生及不典型增生上皮、正常上皮相比,增生及不典型增生与正常上皮相比, MMP-9 阳性表达率升高具有显著性 ($P < 0.05$)。增生及不典型增生上皮 MMP-9 阳性表达率上调,可能是由于正常稳定状态下,组织合成、分泌 MMP-9 量极少,在炎症、肠化、增生、损伤等刺激下,细胞内部调控平衡机制紊乱,合成、分泌 MMP-9 增多。以上结果提示 MMP-9 蛋白阳性表达上调可出现在癌前病变和肺癌的早期阶段, MMP-9 基因激活可能是肺癌发生发展的重要因素,抑制 MMP-9 表达和/或生物活性,有可能是防治肺癌发生和发展的潜在途径之一。

本研究发现肺癌和增生及不典型增生组织中均有 TIMP-1 阳性表达,正常肺组织中 TIMP-1 含量少或缺如。肺癌与增生及不典型增生上皮、正常上皮相比,增生 + 不典型增生与正常上皮相比, TIMP-1 阳性表达率升高具有显著性 ($P < 0.05$)。肺癌组织中 TIMP-1 随着 MMP-9 表达的增高而上调,这可能是基因网络反馈调节机制引起。TIMP-1 增高的机制还不清楚,可解释为^[3]: TIMP-1 对 MMP-9 的反应,癌变时 MMP-9 增高的同时,机体可通过调节增加 TIMP-1 来抑制 MMP-9; TIMP-1 不单是 MMP-9 的抑制剂,它可抑制 MMP-1 和 MMP-3,癌变时后两者的增高也可导致 TIMP-1 的升高; TIMP-1 在抑制 MMP-9 的同时,还具有促进细胞生长(包括肿瘤细胞)的能力,它是血清生长因子活性的重要组成成分。在癌变时,可能有一些其他的因素促发 TIMP-1 表达增高,这有待进一步研究。

大量的研究表明,肿瘤的浸润和转移与其产生和诱导产生 MMPs 降解 ECM 和 BM 的能力密切相关。TIMPs 是 MMPs 的特异性抑制剂,可下调 MMP 的活性来抑制肿瘤的转移。这主要通过两条途径实现的,一是影响 MMP-9 的基因转录,酶原的分泌、激活及其 mRNA 的稳定性来抑制 MMP-9 生物合成;另一条途径则是通过其抑制物 TIMP-1 特异性与活化的 MMP-9 形成不可逆的 1:1 非共价键结合,进而抑制其活性^[4]。TIMPs 与 MMPs 之间的平衡关系在调节 ECM 降解中发挥重要作用。正常组织中 MMPs 和 TIMPs 之间存在着微妙的平衡关系,维持着 ECM 的稳定。癌变时 MMPs、TIMPs 表达上调, TIMPs 增高程度不足以抑制 MMPs 的活性时,两者之间的平衡被打破,导致了 ECM 过度降解。本研究发现, MMP-9

阳性表达上调与肺癌转移相关 ($P < 0.05$),提示肿瘤细胞产生过量的 MMP-9 对基底膜的蛋白水解作用在肿瘤浸润转移中发挥重要作用。陈洪雷等^[5]研究发现,大鼠正常及增生肺组织、肺癌癌前病变及原位癌中 MMP-2/ TIMP-2 阳性率的比值接近 1,而浸润癌、转移癌等晚期癌中,两者的比率增加到 1.67 ~ 2.40,该比值的增加可能导致肺癌 MMP/ TIMP 失衡,促使 ECM 过度降解,发生侵袭转移。

本研究中 MMP-9 的阳性表达与肺癌细胞分化程度呈负相关 ($P < 0.05$),分化越低阳性率越高;不同细胞学类型中阳性率有显著性差异,鳞癌中 MMP-9 阳性表达率低于腺癌、小细胞癌,与 Thomas 等的报道略有差异^[6,7]。本研究中 MMP-9 阳性表达率与肺癌 TNM 分期正相关 ($P < 0.025$),随着分期的增加而升高,分期越晚,表达率越高,而 TIMP-1 与分期无关。对 42 例肺癌术后患者生存时间随访发现,生存时间 < 2 年者 MMP-9、TIMP-1 阳性表达率显著高于生存时间 > 2 年者。这些结果提示 MMP-9 和 TIMP-1 表达可用于患者预后评估,对 MMP-9 和 TIMP-1 高表达者应进行术后化疗和放疗等辅助治疗措施以提高生存

率。至于 MMP-9 和 TIMP-1 是否可作为肺癌独立的预后评估因素,尚待进一步研究积累和进行 COX 模型分析。

参 考 文 献

- 1 Bode W, Fernandez-Catalan C, Grams F, et al. Insights into MMP-TIMP interactions. *Ann N Y Acad Sci*,1999,878(1) 73-91.
- 2 Kleiner DE, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases and metastasis. *Cancer Chemother Pharmacol*,1999,43(Suppl) S42-51.
- 3 陈华江. 基质金属蛋白酶及其抑制物与肿瘤侵袭和转移的关系. 国外医学肿瘤学分册,2001,28(1) 23-25.
- 4 高庆,吴秉铨. 基质金属蛋白酶与肿瘤侵袭和转移. 中华病理学杂志,1998,27(2) 155-156.
- 5 陈洪雷,刁路明,陈德基,等. 大鼠肺癌侵袭转移中明胶酶 A 及基抑制剂的动态表达. 中华肿瘤杂志,2002,24(2) 118-122.
- 6 Suzuki M, Iizasa T, Fujisawa T, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in non-small-cell lung cancer. *Invasion Metastasis*,1998-99,18(3) 134-141.
- 7 Thomas P, Khokha R, Shepherd FA, et al. Differential expression of matrix metalloproteinases and their inhibitors in non-small cell lung cancer. *J Pathol*,2000,190(2) 150-156.

(收稿:2002-05-15 修回:2002-08-07)

(本文编辑 张世雯)

· 作者 编者 读者 ·

中华人民共和国教育部、国家语言文字工作委员会发布的第一批异形词整理表于 2002 年 3 月 31 日开始试行,现将其中在科技期刊中常用的异形词挑选并陈列于下,以资参考。横线前的词为选取的推荐词形。

孢子—胞子	编者按—编者案	标志—标识	参与—参预	掺杂—搀杂
成分—成份	筹划—筹画	凋零—雕零	凋落—雕落	繁衍—蕃衍
分量—份量	风瘫—疯瘫	干预—干与	狐臭—胡臭	过分—过份
关联—关连	折中—折衷	计划—计画	简练—简炼	刻画—刻划
连贯—联贯	连接—联接	连缀—联缀	联结—连结	录像—录象
模仿—摹仿	模糊—模胡	模拟—摹拟	凝练—凝炼	人才—人材
色彩—色采	山楂—山查	思维—思惟	透彻—透澈	图像—图象
稀罕—希罕	稀奇—希奇	稀有—稀有	鸦片—雅片	序言—叙言
与会—预会	影像—影象	盈余—赢余	缘故—原故	芸豆—云豆
战栗—颤栗	仔细—子细	姿势—姿式	肢解—支解、枝解	