

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.03.009

MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中的表达及预后价值

廖渝蓉¹, 胡兴胜², 邹心怡³, 刘雨松⁴

Expression and Prognostic Value of MMP13 in Lung Squamous Carcinoma and Adenocarcinoma

Liao Yurong¹, Hu Xingsheng², Zou Xinyi³, Liu Yusong⁴

1. Department of Respiratory Medicine, The Ninth People Hospital of Chongqing, Chongqing 400700, China; 2. Department of Oncology, Nanchong Central Hospital; 3. Department of Clinical Laboratory, Maternal and Child Care Service Centre of Shifang; 4. Department of Clinical Laboratory, The People's Hospital of Shifang

Corresponding Author: Hu Xingsheng, E-mail: 137666745@qq.com

Abstract: Objective To explore the expression of MMP13 and its relationship with invasion, metastasis and prognosis of lung squamous carcinoma and adenocarcinoma. **Methods** The expression of MMP13 was detected by immunohistochemistry in tissues of 48 specimens of lung squamous carcinoma and 42 specimens of lung adenocarcinoma. **Results** The positive expression rate of MMP13 protein in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma were 68.8% (33/42) and 64.3% (27/42) ($P = 0.654$). The expression rate of MMP13 protein was associated with T stages, lymphatic metastasis and TNM stages ($P < 0.05$) of lung cancer, not with sex, age, smoking, histological classification and differentiation and so on ($P > 0.05$). Kaplan-Meier univariate analysis revealed MMP13 protein expression ($P = 0.001$), TNM stages ($P < 0.001$), lymphatic metastasis ($P < 0.001$) and T stages ($P = 0.018$) having statistical significance for survival time. Cox model analysis revealed MMP13 expression ($P = 0.017$) and lymphatic metastasis ($P = 0.001$) as dangerous factors of independent prognosis in lung cancer. **Conclusion** MMP13 plays an important role in invasion and metastasis of lung cancer, and it may be used as an important prognostic indicator of lung cancer.

Key words: Lung cancer; MMP13; Invasion and metastasis; Prognosis

摘要: 目的 探讨 MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中的表达, 及其与浸润转移和预后的关系。 **方法** 采用免疫组织化学法检测 48 例肺鳞癌和 42 例肺腺癌组织中 MMP13 蛋白的表达。 **结果** MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中的阳性表达率分别为 68.8% (33/42) 和 64.3% (27/42) ($P = 0.654$)。MMP13 蛋白的表达与肺癌的 T 分期、淋巴结转移和 TNM 分期相关 ($P < 0.05$), 而与性别、年龄、吸烟、组织学类型及分化程度等无关 ($P > 0.05$)。Kaplan-Meier 单因素生存分析显示, MMP13 蛋白的表达 ($P = 0.001$)、TNM 分期 ($P < 0.001$)、淋巴结转移 ($P < 0.001$) 和 T 分期 ($P = 0.018$) 对生存期的影响有统计学意义。Cox 多因素分析显示, MMP13 蛋白的表达 ($P = 0.017$) 和淋巴结转移 ($P = 0.001$) 是肺癌的独立预后危险因素。 **结论** MMP13 在肺癌的浸润和转移过程中有着重要的作用, 可能是肺癌的一项重要预后指标。

关键词: 肺癌; MMP13; 浸润和转移; 预后

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

0 引言

目前, 在全球范围内, 肺癌发病率已跃居男性恶

性肿瘤第一位和女性恶性肿瘤第二位^[1], 其死亡率已位居男女恶性肿瘤的第一位。肺癌的 5 年生存率低, 一直徘徊在 15% 左右, 手术患者在 30%~60%, 多数死于浸润转移和复发。研究表明, 肿瘤的浸润转移与某些基因的异常表达密切相关^[2]。基质金属蛋白酶家族 (matrix metallo-proteinases, MMPs) 通过对细胞外基质的降解, 在促进肿瘤的浸润和转移过程中发挥重要的作用。MMP13 属于 MMPs 家

收稿日期: 2012-05-08; 修回日期: 2012-08-14

作者单位: 1. 400700 重庆, 重庆市第九人民医院呼吸内科; 2. 四川省南充市中心医院肿瘤科; 3. 四川省什邡市妇幼保健院检验科; 4. 四川省什邡市人民医院检验科

通信作者: 胡兴胜, E-mail: 137666745@qq.com

作者简介: 廖渝蓉 (1977-), 女, 本科, 主治医师, 主要从事肺癌的研究

族,在 MMPs 激活过程中起关键作用,与肿瘤的浸润转移密切相关。为此,我们采用免疫组织化学法检测了 MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中的表达情况,分析了它与肺癌临床病理特征及预后的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2005 年 1 月—2006 年 11 月重庆医科大学胸心外科手术标本 90 例,含 48 肺鳞癌和 42 例肺腺癌。所有患者术前均未行化疗或放疗,均有完整的临床资料和明确的病理诊断。其中男 65 例,女 25 例;<60 岁 46 例,≥60 岁 44 例;不吸烟者 38 例,吸烟者 52 例;按照 2002 ATCC 肺癌分期标准分为:高分化 13 例,中分化 61 例,低分化 16 例;T1 期 11 例,T2 期 63 例,T3 期 11 例,T4 期 5 例;N0 期 62 例,N1~3 期 28 例;均为 M0 期;I 期 50 例,II 期 7 例,III 期 33 例。

所有患者每 3 月均进行一次电话随访,随访开始于 2005 年 4 月,结束于 2012 年 3 月,研究 5 年生存率。

1.2 试剂

兔抗人多克隆抗体 MMP13 购自北京博奥森生物公司,PV9000 免疫组织化学二抗试剂盒和 DAB 显色剂均购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 免疫组织化学检测 MMP13 蛋白的表达

采用石蜡包埋标本,常规切片,厚度 5 μm。应用免疫组织化学 PV9000 二步法,具体步骤按照说明书进行。用 PBS 液代替一抗作为阴性对照,用已知 MMP13 表达阳性病例作阳性对照。结果判断:所有切片均采用双盲法由两位病理科医师独立阅片。MMP13 阳性表达定位于细胞质,呈浅黄色、黄色或棕黄色。按照参考文献^[2],随机选择 10 个高倍

镜视野,每个视野连续计数 100 个细胞,计数阳性细胞百分比。染色强度按下列标准评定计分:0 分为无色;1 分为浅黄色;2 分为棕黄色;3 分为棕褐色。染色的阳性细胞所占比例按下列标准评定计分:0 分为阴性细胞或弱阳性细胞<5%,1 分为阳性细胞 5%~25%,2 分为阳性细胞>25%~50%,3 分为阳性细胞>50%~75%,4 分为阳性细胞>75%。将上述两种评分相乘,将结果分为:0 分为阴性(-);1~4 分为弱阳性(+);5~8 分为中度阳性(++);9~12 分为强阳性(+++)。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件包进行统计分析。率的构成比采用χ²检验,单因素生存分析采用 Kaplan-Meier 生存曲线和 Log rank 检验,多因素生存分析采用 Cox 多因素分析模型,以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP13 蛋白检测结果

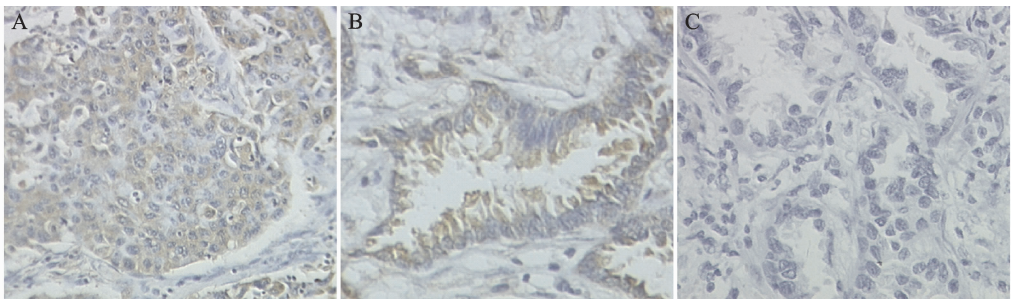
MMP13 阳性表达位于肿瘤细胞质,见图 1。MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中的阳性率分别为 68.8%(33/48)和 64.3%(27/42),两者比较,差异无统计学意义(χ² = 0.201, P = 0.654),在肺癌中总阳性率为 66.7%(60/90)。

2.2 MMP13 蛋白表达与肺癌临床病理特征的联系

统计学结果显示,MMP13 表达随着肺癌 T 分期的增加、淋巴结转移和 TNM 分期的增加而增强(P<0.05),而与性别、年龄、吸烟、组织学类型及分化程度等无关(P>0.05),见表 1。

2.3 生存分析

90 例患者在随访期间共有 10 例失访,按统计学处理规则,失访数据均按存活病例计算。死亡病



A: positive expression in lung squamous carcinoma; B: positive expression in lung adenocarcinoma; C: negative control

图 1 MMP13 在肺鳞癌和腺癌组织中的表达(免疫组织化学 ×200)

Figure 1 MMP13 expression in lung squamous carcinoma and adenocarcinoma tissues(IHC ×200)

例 58 例,均死于肿瘤复发、进展。Kaplan-Meier 生存分析显示,MMP13 表达阳性组 5 年生存率为 21.9%,阴性组为 53.1%,两组比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 11.192, P = 0.001$),见图 2。TNM 分期($\chi^2 = 61.134, P < 0.001$)、淋巴结转移($\chi^2 = 62.495, P < 0.001$)和 T 分期($\chi^2 = 10.036, P = 0.018$)亦对肺癌患者生存期的影响差异有统计学意义。

表 1 MMP13 的表达与肺鳞癌和肺腺癌的临床病理特征联系
Table 1 Correlation of MMP13 expression to clinicopathologic characteristics of lung squamous carcinoma and adenocarcinoma

Variable	Cases	MMP13 positive(%)	χ^2	P
Gender				
Male	65	46(70.8)	1.772	0.183
Female	25	14(56.0)		
Age(years)				
<60	46	33(71.7)	1.089	0.297
≥60	44	27(61.4)		
Smoking				
No	38	23(60.5)	1.116	0.291
Yes	52	37(71.2)		
Histological classification				
Squamous carcinoma	48	33(68.8)	0.201	0.654
Adenocarcinoma	42	27(64.3)		
Differentiation				
Well and moderate	74	46(62.2)	3.801	0.051
Poor	16	14(87.5)		
T stages				
T1 + T2	74	45(60.8)	6.423	0.011
T3 + T4	16	15(93.8)		
Lymphatic metastasis				
N0	62	37(59.7)	4.381	0.036
N1 - 3	28	23(82.1)		
TNM stage				
I + II	57	32(56.1)	7.751	0.005
III	33	28(84.8)		

表 2 对本组肺癌患者生存期有影响的临床病理因素 Cox 多因素分析结果

Table 2 Cox variables of clinicopathologic characteristics impacting on survival of lung cancer patients in this study

	B	SE	Wald	df	Sig.	RR	RR 95%CI	
							Lower limit	Upper limit
MMP13	0.781	0.326	5.742	1	0.017	2.183	1.153	4.135
TNM stages	0.302	0.275	1.201	1	0.273	1.352	0.788	2.319
Lymphatic metastasis	1.809	0.548	10.892	1	0.001	6.107	2.085	17.883
T stages	0.394	0.226	3.032	1	0.082	1.483	0.952	2.311

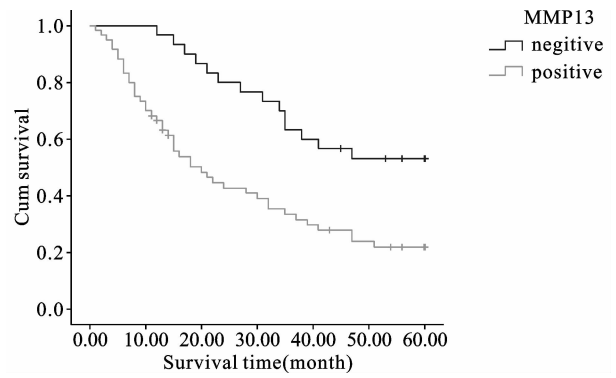


图 2 MMP13 表达阳性和阴性肺癌患者 Kaplan-Meier 生存曲线
Figure 2 The Kaplan-Meier survival curves of lung cancer patients with MMP13 positive and negative expression

把单因素分析发现对生存期有影响的 T 分期、淋巴结转移、TNM 分期及 MMP13 表达,纳入 Cox 多因素分析模型。结果显示,只有 MMP13 ($P = 0.017$)和淋巴结转移 ($P = 0.001$)是肺癌患者的独立预后危险因素,见表 2。

3 讨论

肿瘤的浸润和转移是多因素、多步骤参与的复杂过程。但肿瘤细胞要浸润转移,首先必须突破细胞外基质的屏障。MMPs 是细胞外基质降解的主要酶类,此外,还能调节血管生成和肿瘤的生长等。因此,MMPs 自发现以来一直是肿瘤浸润转移的研究热点之一。MMP13 基因位于人染色体 11q22-23。MMP13 位于 MMPs 级联反应的中心位置,可以被多种 MMPs 如 MMP2、MMP3 和 MT-MMP 活化,并能激活多种 MMPs 如 MMP2、MMP9 等,作用底物最为广泛,几乎可以降解除胶原外的所有细胞外基质和基底膜成分。因此,MMP13 在肿瘤的浸润转移过程中具有更重要的意义。

研究表明,MMP13 在多种恶性肿瘤组织中过表达,如口腔鳞癌^[3]、恶性黑色素瘤^[4]等,并与浸润转移相关。Huang 等^[5]检测发现,MMP13 在结直肠癌组织中阳性率为 52.5%(42/80),其阳性率与肿

瘤大小、临床分期、T 分期、淋巴结转移及术后复发密切相关,其蛋白表达在癌细胞株中的阳性率为 100%。Stokes 等^[6]研究表明,MMP13 在头颈部肿瘤组织中高表达,在癌旁组织中中度表达,而正常组织中不表达,在肿瘤大于 4 cm 组中的表达强度明显升高。Chang 等^[7]用基因芯片技术对人乳腺癌组织中 371 个过表达基因检测发现,MMP13 是诊断乳腺癌特异性最高的四个基因之一,在 15 例乳腺癌组织中 MMP13 mRNA 和蛋白阳性率均为 100%,在乳腺癌、肺癌及颈部肿瘤细胞系中均高表达,但在人正常肺细胞系中不表达。在肺癌的研究中,Hsu 等^[8]研究发现,MMP13 mRNA 在人肺癌组织中阳性率为 59.6%(34/57),其表达与肿瘤骨髓侵犯相关,MMP13 阳性表达组 5 年生存率为 26.47%,显著低于阴性组 50.69%($P = 0.025$),并且是独立不良预后危险因素。

本研究发现,MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中总阳性率为 66.7%,与肺癌的组织学类型差异无统计学意义,但与肿瘤 T 分期、淋巴结转移和 TNM 分期有关,与文献报道基本一致。T 分期是肿瘤大小和侵袭能力的综合反映,肿瘤直径越大、浸润深度越深、累及周围组织越多,T 分期越高。研究已经证实,同一瘤体内癌细胞之所以具有不同的转移特性,是因为在肿瘤的多克隆增殖过程中,发生了不同基因的异常表达,通过演进,形成具有不同生物学特性亚克隆,获得具有不同浸润转移能力的结果。MMP13 在有淋巴结转移组中高表达,提示其异常表达是肿瘤转移过程中的一个分子事件。其机制除直接降解 ECM 外,还可能通过激活 MMP2、MMP9 等,其中 MMP2 在肿瘤侵袭作用中起着举足轻重的作用,还与调节血管生成及癌细胞生长等有关。

本研究通过 Kaplan-Meier 方法绘制了 MMP13 阳性和阴性表达患者的生存曲线,结果显示 MMP13 阳性组 5 年生存率显著低于阴性组,表明 MMP13 的表达水平对肺癌的生存期有一定的影响。同时,T 分期、淋巴结转移及 TNM 分期亦是肺癌的预后影响因素。但进一步采用 Cox 多因素分析模型发现,只有 MMP13 表达和淋巴结转移是肺癌的独立预后危险因素,这与 Hsu 等^[8]在肺

癌中的研究报道基本一致。以上提示,MMP13 的异常表达可能是肺癌不良预后中的一个重要影响因素。

综上所述,本研究发现 MMP13 在肺鳞癌和肺腺癌组织中高表达,并与肿瘤浸润转移及预后密切相关。MMP13 可能是肺癌的一项独立预后指标。肺癌是一种恶性程度较高的肿瘤,其预后十分不理想,这可能是某些基因异常表达的结果。因此,我们可以通过对 MMP13 的检测,更好地判断肺癌的恶性程度,为靶向治疗提供新的靶点,为进一步研究肺癌的发病机制提供新的思路。

参考文献:

- [1] Jema A, Bray F, Center MM, et al. Global Cancer Statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2011, 61(2): 69-90.
- [2] Hu XS, Chen H, Bu YQ. Expression and significance of ETS-1 and U-PA in Non-small cell lung cancer [J]. Sheng Ming Ke Xue Yan Jiu, 2010, 14(5): 436-41. [胡兴胜, 陈虹, 卜友泉. 非小细胞肺癌组织中 ETS-1 和 U-PA 的表达及意义 [J]. 生命科学, 2010, 14(5): 436-41.]
- [3] Su YY, Zhu EX, Ma WD, et al. Expression and pathological significance of c-fos and MMP13 in Human oral squamous cell carcinoma [J]. Kou Qiang Yi Xue Yan Jiu, 2009, 25(1): 23-5. [苏颖颖, 朱恩新, 马卫东, 等. c-fos 及基质金属蛋白酶 13 在人口腔鳞状细胞癌发生中的表达及病理意义 [J]. 口腔医学研究, 2009, 25(1): 23-5.]
- [4] Corte MD, Gonzalez LO, Corte MG, et al. Collagenase-3(MMP-13) expression in cutaneous malignant melanoma [J]. Int J Biol Markers, 2005, 20(4): 242-8.
- [5] Huang MY, Chang HJ, Chung FY, et al. MMP13 is a potential prognostic marker for colorectal cancer [J]. Oncol Rep, 2010, 24(5): 1241-7.
- [6] Stokes A, Joutsa J, Ala-Aho R, et al. Expression profiles and clinical correlations of degradome components in the tumor microenvironment of head and neck squamous cell carcinoma [J]. Clin Cancer Res, 2010, 16(7): 2022-35.
- [7] Chang HJ, Yang MJ, Yang YH, et al. MMP13 is potentially a new tumor marker for breast cancer diagnosis [J]. Oncol Rep, 2009, 22(5): 1119-27.
- [8] Hsu CP, Shen GH, Ko JL. Matrix metalloproteinase-13 expression is associated with bone marrow microinvolvement and prognosis in non-small cell lung cancer [J]. Lung Cancer, 2006, 52(3): 349-57.

[编辑校对:周永红]