

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.10.020

PTTG 和 MMP-9 蛋白表达在食管癌 临床分期中的价值

李娟, 祝淑钗, 刘志坤, 苏景伟, 沈文斌

Value of Protein Expression PTTG and MMP-9 with Clinical Stage of Esophageal Carcinoma

Li Juan, Zhu Shuchai, Liu Zhikun, Su Jingwei, Shen Wenbin

*The Third Department of Radiotherapy, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China**Corresponding Author: Zhu Shuchai, E-mail: sczhu@heinfo.net*

Abstract: Objective To explore the function of PTTG and MMP-9 protein expression and evaluate their relationship with clinical stage of esophageal carcinoma. **Methods** Immunohistochemistry SP was used to check the protein expression of PTTG and MMP-9 in biopsy tissue specimen of 84 cases esophageal carcinoma, and the relationship between protein expression level and clinical stage grades was analyzed. **Results** PTTG and MMP-9 protein were high expression and with positive correlation in esophageal carcinoma. Positive expression rate were higher in late clinical stage than that in early stage in esophageal carcinoma. **Conclusion** PTTG and MMP-9 are high expression, and the two sorts of protein expression have a positive correlation with clinical stage of esophageal carcinoma. It suggests that PTTG and MMP-9 genes play an important role in regulating occurrence, development, invasion and metastasis of esophageal carcinoma.

Key words: Esophageal carcinoma; Clinical Staging; PTTG; MMP-9; Prognosis

摘要:目的 研究 PTTG 和 MMP-9 在食管癌中的表达及其相关性,探讨它们对食管癌临床分期的价值。**方法** 应用免疫组织化学 SP 法检测 84 例食管癌组织中 PTTG 和 MMP-9 蛋白表达,结合临床病理参数并将其纳入食管癌临床分期进行预后分析。**结果** PTTG 和 MMP-9 在食管癌组织中均呈阳性表达,且两者表达呈正相关。PTTG、MMP-9 蛋白在食管癌临床分期较晚的患者中阳性表达率明显高于临床分期早的患者。**结论** PTTG 和 MMP-9 蛋白在食管癌组织中呈高表达,且与食管癌临床分期显著正相关,提示两者在食管癌发生、发展及侵袭转移过程中可能起重要作用。

关键词: 食管癌; 临床分期; 垂体瘤转化基因; 基质水解蛋白酶-9; 预后

中图分类号: R735.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)10-1243-03

0 引言

恶性肿瘤复发和转移是导致患者死亡的最主要原因,食管癌也不例外。在癌细胞中正常调控通路异常活化或抑制,参与肿瘤的发生发展和转移。垂体瘤转化基因(pituitary tumor transforming gene, PTTG)在肿瘤细胞中受 β -catenin/TCF 通路调节^[1],其高表达可以促进肿瘤细胞的体外迁移和侵袭^[2-3],且 PTTG 可以促进基质水解蛋白酶家族(MMPs)的活化和表达^[4],MMP-9 是 MMPs 家族重要成员之一,在基质降解和血管生成中发挥重要作用。本研究通过检测 84 例食管癌组织中 PTTG 和 MMP-9 蛋白的表达,分析其表达的相关性、与食管癌临床分期及预后的关系,拟为临床治疗提供有益的理论依据。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集 2008 年 7 月—2010 年 7 月食管癌病理标本 84 例,所有病例治疗前均行超声内镜(endoscopic ultrasonography, EUS)、胸腹部 CT、血液学等常规检查。其中手术治疗 48 例,三维适形放疗 36 例;男 55 例,女 29 例,中位年龄 63(48~82)岁;胸上段 2 例,胸中段 68 例,胸下段 14 例;鳞癌 82 例,小细胞癌 2 例。手术患者依据术后病理分期;放疗患者临床 T 分期依据 EUS 结果判断;临床 N 分期依据 EUS 及 CT 综合判断;临床分期依据 2002 年 UICC 食管癌国际 TNM 分期标准。全组患者 T1、T2、T3、T4 期分别为 8、34、36、6 例;N0、N1 期分别为 50、34 例;临床 I、II、III、IV 期分别为 6、53、24、1 例。

1.2 检测方法

采用免疫组织化学 SP 法,1:50 浓度稀释的兔抗人 PTTG 多克隆抗体、1:20 浓度稀释的兔抗人 MMP-9 多克隆抗体及 IgG 二抗工作液、SP 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。染色步骤参照试剂说明书完成。标本经 4% 多聚甲醛固定,石

收稿日期:2011-12-05;修回日期:2012-04-08

作者单位:050011 石家庄,河北医科大学第四医院放疗三科

通信作者:祝淑钗, E-mail: sczhu@heinfo.net

作者简介:李娟(1977-),女,博士,主治医师,主要从事肿瘤放射治疗学的研究

蜡包埋,5 μm 连续切片,HE 染色。

1.3 判断标准

光学显微镜下阅片,双盲法计数阳性细胞,5 个高倍视野(×400)计数取均值。PTTG 蛋白阳性表达为细胞质和(或)细胞核出现棕黄色颗粒;MMP-9 蛋白阳性表达主要为细胞质出现棕黄色颗粒,部分为细胞质和(或)细胞核出现棕黄色颗粒。阳性分级标准:参考 Iseki K 标准^[5],根据细胞染色强弱及阳性细胞数两个方面综合判断并转化成阳性指数:a:染色强度(0:无,1:弱,2:中,3:强);b:阳性细胞数(0:无阳性细胞,1:阳性细胞数<25%,2:阳性细胞数 25%~50%,3:阳性细胞数>50%)。a+b 得分为 0~1,则阳性指数为 0;a+b 为 2,则阳性指数为 1;a+b 为 3,则阳性指数为 2;a+b 为 4~5,则阳性指数为 3;a+b 为 6,则阳性指数为 4。综合记分<2 为阴性表达,≥2 为阳性表达,阳性表达率=阳性表达例数/总例数。

1.4 统计学方法

采用 SPSS11.5 软件包进行分析。计数资料采用 χ^2 检验,蛋白表达指标之间及其与部分临床病理因素之间的相关关系采用 Spearman 等级相关检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

表 1 PTTG 和 MMP-9 蛋白表达与临床病理因素的关系

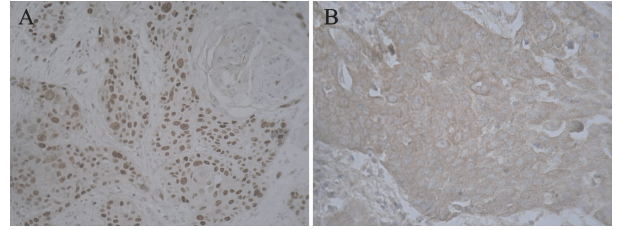
Table 1 The relationship between PTTG, MMP-9 protein expression and the clinicopathological parameters in esophageal carcinoma

Clinical characteristic	n	PTTG positive case(%)	χ^2	P	MMP-9 positive case(%)	χ^2	P
Age(years)							
<60	31	21(67.7)			23(74.2)		
≥60	53	37(69.8)	0.005	0.941	29(54.7)	3.146	0.076
Gender							
Male	55	39(70.9)			36(65.5)		
Female	29	16(55.2)	2.080	0.149	16(55.2)	0.851	0.356
Tumor length							
<5 cm	37	21(56.8)			21(56.8)		
≥5 cm	47	36(76.6)	3.736	0.053	31(66.0)	0.743	0.389
Invasion depth							
<15 mm	45	26(57.8)			22(48.9)		
≥15 mm	39	32(82.1)	5.760	0.014	30(77.0)	6.963	0.007
Tumor volume							
<40 cm ³	46	26(56.5)			24(52.2)		
≥40 cm ³	38	32(84.2)	7.465	0.006	28(73.7)	4.083	0.043
Differentiation degree							
Well differentiated	48	37(77.1)			31(64.6)		
Poor differentiated	36	21(58.3)	3.384	0.055	21(58.3)	0.341	0.360
T stage							
T1~2	42	23(54.8)			18(42.9)		
T3~4	42	35(83.3)	8.021	0.004	34(81.0)	12.923	0.000
N stage							
N0	50	25(50.0)			21(42.0)		
N1	34	33(97.1)	20.971	0.000	31(91.2)	20.753	0.000
TNM							
I~II	59	34(57.6)			28(47.5)		
III~IV	25	24(96.0)	12.098	0.000	24(96.0)	17.545	0.000
Metastasis							
With	68	42(61.8)			37(54.4)		
Without	16	16(100)	8.860	0.001	15(93.8)	8.499	0.002

2 结果

2.1 PTTG 和 MMP-9 在食管癌组织中的表达

PTTG 和 MMP-9 在食管癌组织中阳性表达率分别为 69.1%(58/84)、61.9%(52/84),见图 1。两者表达呈正相关(相关系数 $r=0.588, P=0.000$)。



A:PTTG positive expressed as brownish yellow granules at cytoplasm(or) nucleus of cell;B:MMP-9 positive expressed as brownish yellow granules primany at cytoplasm, part of the cytoplasm and (or) nucleus of cell; PTTG: pituitary tumor transforming gene

图 1 PTTG、MMP-9 在食管癌组织中的表达(SP ×400)
Figure 1 Expression of PTTG and MMP-9 in primary site of esophageal squamous cell(SP ×400)

2.2 PTTG 和 MMP-9 蛋白表达与临床病理因素的关系

PTTG 和 MMP-9 蛋白表达均与肿瘤外侵程度、体积大小、有无转移及临床分期相关,而与患者性别、年龄、肿瘤长度、组织学分化程度无关,见表 1。

2.3 PTTG 和 MMP-9 蛋白表达与 TNM 分期的相关性

PTTG 蛋白表达与 T 分期、N 分期、TNM 分期的相关系数 r 分别为 0.309、0.500、0.380, $P < 0.05$ 。MMP-9 蛋白表达与 T 分期、N 分期、TNM 分期的相关系数 r 分别为 0.392、0.497、0.457, $P < 0.05$ 。

3 讨论

PTTG 是一种原癌基因,在大多数正常组织中极低表达,但在肿瘤细胞中,如乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肺癌等组织中呈高表达^[6-9]。过表达的 PTTG 可能是通过促进细胞增殖、诱导细胞转化及抑制染色体分离等机制参与肿瘤的形成。Shibata 等^[3]用 RT-PCR 技术检测了 48 例食管癌组织,结果显示食管癌组织中 PTTG 高表达与肿瘤侵袭及生存期缩短有关,而转录水平的表达增高与淋巴结转移有关。林称意等^[10]研究发现:PTTG 在食管癌组织中阳性表达率为 72.9%,显著高于癌旁正常食管组织中的表达 10.4%,且表达与有无淋巴结转移、TNM 分期显著相关。本研究结果显示 PTTG 在食管癌组织中阳性表达率为 69.05%,且在 T3~4、N1、M1 及临床 III~IV 期的表达明显高于 T1~2、N0、M0 及临床 I~II 期的表达,说明 PTTG 参与肿瘤的恶性化过程,且临床分期越晚表达越高,提示 PTTG 高表达可以促进食管癌组织的侵袭转移,有可能成为食管癌预后不良的分子标志物。

侵袭性生长是恶性肿瘤的特征之一,MMP-9 能够降解细胞外基质(extracellular matrix,ECM)和基底膜的主要成分 IV 型胶原蛋白,在多种恶性肿瘤细胞中高表达,且与肿瘤的侵袭、转移和预后明显相关。Ohashi K 等^[11]用 SP 法检测 148 例食管鳞癌术后标本中 MMP-9 蛋白的表达,发现在癌组织中表达明显增强,且与肿瘤浸润深度显著相关。王亚飞等^[12]用 SP 法检测 59 例食管鳞癌咬检标本中 MMP-9 的表达,发现 MMP-9 在食管癌组织的阳性表达率为 84.75%,高于癌旁组织表达 39.02%,两者差异具有统计学意义($P < 0.01$),且与 CT 浸润深度明显相关,认为食管癌分期越晚,其蛋白表达率越高,说明 MMP-9 在食管癌浸润转移过程中起重要作用。本研究结果显示 MMP-9 在食管癌组织中阳性表达率为 61.90%,且在 T3~4、N1、M1 及临床 III~IV 期的表达明显高于 T1~2、N0、M0 及临床 I~II 期的表达,说明 MMP-9 在肿瘤生长、侵袭和转移的微环境方面扮演着重要角色,其蛋白表达与食管癌临床分期显著正相关,肿瘤期别越晚,表达越高,预后不良。在 MMP-9 蛋白表达与食管癌远期预后价值方面,因本组病例随访时间较短,有待进一步延长随访时间说明。

Malik 等^[4]在对 HEK293 细胞的研究中发现,PTTG 可能是通过在基因转录水平影响 MMP-2 的表达,增加 MMP-2 蛋白的分泌和活化,而发挥促进肿瘤

侵袭和转移的能力。本研究结果显示随着 PTTG 在食管癌组织中表达量的升高或降低,MMP-9 的表达呈升高或降低趋势,两者呈正相关, ($r = 0.588, P = 0.000$),说明在食管癌组织中 PTTG 促进侵袭和转移是通过调控 MMP-9 的表达而实现。

食管癌的病理分期是目前公认的判断食管癌预后的标准。本研究进一步分析 PTTG 和 MMP-9 的表达与 T、N、TNM 分期的相关性,结果显示均呈正相关,T、N、TNM 分期越晚,两者阳性表达率越高,肿瘤侵袭能力越强,局部复发及远处转移的概率增加,预后越差。

综上所述,PTTG 和 MMP-9 在食管癌的发生、发展及侵袭转移过程中起重要作用,其可能成为反映食管癌生物学行为及侵袭性的重要指标,有待为临床治疗提供有益的理论依据。

参考文献:

- [1] Zhou C, Liu S, Zhou X, et al. Overexpression of human pituitary tumor transforming gene (hPTTG), is regulated by beta-catenin /TCF pathway in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. Int J Cancer, 2005, 113(6): 891-8.
- [2] Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, et al. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors [J]. Nat Genet, 2003, 33(1): 49-54.
- [3] Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, et al. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2002, 32(7): 233-7.
- [4] Malik MT, Kakar SS. Regulation of angiogenesis and invasion by human pituitary tumor transforming gene (PTTG) through increased expression and secretion of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) [J]. Mol Cancer, 2006, 5: 61.
- [5] Iseki K, Tatsuta M, Uehara H, et al. Inhibition of angiogenesis as a mechanism for inhibition by 1 α -hydroxyvitamin D₃ and 1, 25-dihydroxyvitamin D₃ of colon carcinogenesis induced by azoxymethane in Wistar rats [J]. Int J Cancer, 1999, 81(5): 730-3.
- [6] Shibata Y, Haruki N, Kuwabara Y, et al. Expression of PTTG (pituitary tumor transforming gene) in esophageal cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2002, 32(7): 233-7.
- [7] Wen CY, Nakayama T, Wang AP, et al. Expression of pituitary tumor transforming gene in human gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(4): 481-3.
- [8] Heaney AP, Singson R, McCabe CJ, et al. Expression of pituitary tumour transforming gene in colorectal tumours [J]. Lancet, 2000, 355(9205): 716-9.
- [9] Puri R, Tousson A, Chen L, et al. Molecular cloning of pituitary tumor transforming gene from ovarian tumors and its expression in tumors [J]. Cancer Lett, 2001, 163(1): 131-9.
- [10] Lin CY, Guo JL, Zuo SQ, et al. Expression and correlation of PTTG and c-myc in esophageal carcinoma [J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2009, 36(5): 415-8. [林称意, 郭家龙, 左顺庆, 等. PTTG 与 c-myc 在食管癌中的表达及其相关性 [J]. 肿瘤防治研究, 2009, 36(5): 415-8.]
- [11] Ohashi K, Nemoto T, Nakamura K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas [J]. Cancer, 2000, 88(10): 2201-9.
- [12] Wang YF, Zhu SC, Shen WB, et al. MMP-9 protein expression in esophageal squamous cell carcinoma and its clinical significance [J]. Hebei Yi Ke Da Xue Xue Bao, 2008, 29(3): 328-32. [王亚飞, 祝淑叔, 沈文斌, 等. 食管癌中 MMP-9 蛋白表达及其临床意义 [J]. 河北医科大学学报, 2008, 29(3): 328-32.]