

VEGF、MMP-2 与 TIMP-2 在大肠癌中的表达

李春光¹, 刘铭球², 蒋辉³, 蓝海¹

Study on the expression of the inhibitor of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in colorectal carcinoma

LI Chun-guang, LIU Ming-qiu, JIANG Hui, et al

Oncology Department of Wuhan University Zhongnan Hospital, Wuhan 430071, China

Abstract: Objective To investigate the expression of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 and their relationship between these three proteins, as well as the relationship between the expression of these proteins and the biological behavior of carcinoma. **Methods** Immunohistochemical method was used to detect the expression of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in the carcinoma tissues and normal tissues around the foci. The relationship between these three proteins, together with the relationship between these proteins and the biological activity of carcinoma was further investigated. **Results** The expression of VEGF and MMP-2 were high in carcinoma tissues while low in normal tissues. As for P33^{ING1}, the case is to the contrary. There is correlation between the expression of these proteins. And there is also statistical correlation between the expression of these protein and the tissue type, tumor differentiation, metastasis of lymph node, Duke's stage, and five-year survival. **Conclusion** The high expression of VEGF, MMP-2 and TIMP-2 in carcinoma increases markedly by important factors involved in carcinogenesis, development, invasion and metastasis, which can be used as a predictor of malignant behavior of colorectal carcinoma.

Keywords: Colorectal carcinoma; Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF); matrix metallo proteinase-2 (MMP-2); tissue inhibitor of metallo proteinases (TIMP-2)

摘要:目的 研究 VEGF、MMP-2 与 TIMP-2 在大肠癌组织中的表达、相互关系及与肿瘤生物学行为的相关性。方法 对 54 例大肠癌患者的手术切除之癌组织和癌周正常组织,应用免疫组织化学方法检测其 VEGF、基质金属蛋白酶 MMP-2 和组织金属蛋白酶抑制剂 TIMP-2 的表达情况,探讨两者之间的相互关系及其与肿瘤生物学行为的相关性。结果 VEGF、MMP-2 与 TIMP-2 这三种蛋白在肿瘤组织中表达水平明显高于在正常组织中的表达。这三种蛋白的表达呈正相关,且表达水平与组织类型、组织分化程度、淋巴结转移、临床分期和五年生存率有统计学相关性 ($P < 0.05$)。结论 大肠癌中 VEGF、MMP-2 与 TIMP-2 的表达,可能是癌肿发生、生长和浸润转移的重要因素,可作为判断肿瘤恶性程度的重要指标。

关键词: 大肠癌; 血管内皮生长因子; 基质金属蛋白酶 MMP-2; 组织金属蛋白酶抑制剂 TIMP-2

中图分类号: R735.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004) 01-0021-03

0 引言

本实验采用免疫组织化学方法研究基质金属蛋白酶 MMP-2 及其抑制物 TIMP-2 和 VEGF 的表达及其与大肠癌生物学行为的相互关系。

1 材料和方法

1.1 材料 收集武汉大学中南医院 1997 年 1 月 ~ 1998 年 6 月手术切除的大肠癌石蜡包埋组织标本 54 例,男 32 例,女 22 例;年龄 42 岁至 76 岁,平均年龄为 57 岁。所有病人术前均未接受放疗。其

中高、中分化大肠癌 17 例,低分化 37 例,术前 Duke's 分期 A 期 15 例, B 期 12 例, C 期 16 例, D 期 11 例。同时取距上述癌组织边缘 10cm 处的正常组织石蜡标本。以上所有标本均经过临床和病理诊断证实。

1.2 主要试剂 抗 MMP-2 和抗 TIMP-2 鼠源单克隆一抗,购于福州迈新试剂公司;抗 VEGF 鼠源单克隆一抗,购于武汉博士德试剂公司;S-P 试剂盒和 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB),购于北京中山试剂公司。

1.3 组织标本的制备 将组织标本(大肠癌和正常组织)经福尔马林固定后,脱水、透明、浸蜡包埋,4 保存,收齐后制备成 4 μ m 厚连续切片。

1.4 H-E 染色 切片脱蜡入水后水洗,苏木精室温

收稿日期:2003-08-29; 修回日期:2003-11-07

作者单位:1.430071 武汉大学中南医院肿瘤科,2. 病理教研室;3 湖北省肿瘤医院化疗科

下染色 1min,1% 盐酸酒精分色 3 秒,1% 氨水返蓝 5min, 伊红室温下复染 5min, 再梯度脱水透明,中性树脂封片。镜下观察组织形态学变化。

1.5 组织标本免疫组织化学染色 用免疫组织化学(S-P 法)检测 VEGF、MMP-2 和 TIMP-2 蛋白三种标志物的表达变化,按试剂说明书进行操作。切片脱蜡入水后,3% H_2O_2 室温孵育 15min,PBS 水洗 5min \times 3 次,柠檬酸盐缓冲液微波修复 95 ~ 98 15min, 自然冷却至室温(约 25)。擦干切片周围水份,正常封闭血清室温下孵育 15min, 甩干,加入一抗工作液 37 下孵育 2h(空白对照片不加一抗,用 PBS 替代,其余步骤不变) PBS 漂洗 3 次,加入生物素标记的二抗,37 下孵育 15 ~ 20min,PBS 漂洗 3 次,SP 复合物 37 下孵育 15 ~ 20min, 使其充分反应,PBS 漂洗 5min \times 3 次,DAB 室温下显色,镜控反应时间,充分冲洗中止反应。苏木精复染胞核,染色 1min,1% 盐酸酒精分色 3 秒,1% 氨水返蓝 5 min, 脱水透明、封片。

1.6 阳性结果的判定和图像分析 VEGF,MMP -2 和 TIMP-2 在光镜下有棕黄色颗粒反应出现在细胞膜、细胞浆中均为阳性反应细胞。根据阳性肿瘤细胞数的百分比判断结果。其中 VEGF 高倍镜下阳性细胞数占视野 10% 以下为阴性(-);大于 10% 以

上计为阳性。10% ~ 30% 为(+),30% ~ 50% 为(++) ,>50% 为(+++)。MMP-2 和 TIMP-2 高倍镜下未见阳性细胞者为阴性(-);阳性细胞数占视野 25% 以下为弱阳性(+);25% ~ 75% 者为阳性(++) ;>75% 为强阳性(+++)。

1.7 统计学分析 用统计分析软件 SPSS11.0 对各指标表达结果进行统计学处理, 取 $\alpha = 0.05$ 水准。

2 结果

2.1 H-E 染色结果

肿瘤组织中癌细胞体积大,核大而圆,病理分裂相多见,肿瘤呈浸润性生长,其中新生血管分布呈明显的异质性、新生血管面积小,畸形扭曲或扩张,有的缺乏完整的基膜结构,新生血管多位于肿瘤组织的边缘部分,在浸润灶旁可见明显的新生血管增生。

2.2 VEGF、MMP-2 和 TIMP-2 在大肠组织中的表达

三者均在正常大肠组织免疫反应呈弱阳性信号,在癌组织中呈强阳性信号,阳性物质呈棕黄色,且主要位于胞膜和胞浆,其中强阳性染色的肿瘤细胞多位于肿瘤浸润前缘,结果如表 1 所示。

表 1 VEGF、MMP-2 和 TIMP-2 在大肠癌组织中的表达

项目	例数	阴性(-)	阳性			阳性率(%)	P 值
			+	++	+++		
组织类型							
大肠癌组织	54	11/13/7	11/16/15	13/18/26	19/7/6	79.6/75.9/87.0	0.000/0.000/0.000
正常组织	54	43/35/31	9/11/14	2/8/7	0/0/2	20.4/35.2/42.6	
组织分化程度							
高、中分化	17	7/9/5	3/5/11	5/2/1	2/1/0	58.8/47.1/70.6	0.007/0.001/0.000
低分化	37	4/4/2	8/11/4	8/16/25	17/6/6	82.9/89.2/94.6	
淋巴结转移							
无	19	7/11/6	5/5/9	5/3/3	2/0/1	63.2/42.1/64.8	0.003/0.000/0.000
有	35	4/2/1	6/11/6	8/15/23	17/7/5	88.6/94.3/97.1	
Duke 's 分期							
A+B	27	8/8/5	9/11/13	6/6/6	4/2/3	70.4/70.4/81.5	0.001/0.035/0.003
C+D	27	3/5/2	2/5/2	7/12/20	15/5/3	88.9/81.5/92.6	
5 年存活率							
>5 年	36	10/12/6	9/15/13	12/6/16	5/3/1	72.2/66.7/83.3	0.000/0.000/0.003
5 年	18	1/1/1	2/1/2	1/12/10	14/4/5	94.4/94.4/94.4	

注:表中数据依次代表 VEGF/MMP -2/TIMP -2 的例数及结果

2.3 VEGF、MMP-2 和 TIMP-2 在大肠组织中的表达的相关性分析

对 VEGF、MMP-2 和 TIMP-2 在大肠癌组织中表达情况,俩俩均采用 spearman 等级相关分析,

VEGF 和 MMP-2 相关系数 $r_s = 0.762$, $P = 0.000$, VEGF 和 TIMP-2 相关系数 $r_s = 0.698$, $P = 0.000$, MMP-2 和 TIMP-2 相关系数 $r_s = 0.671$, $P = 0.000$,表明他们之间有明显相关性。

3 讨论

近年来,人们对肿瘤浸润与转移机制进行了广泛的研究,发现血管内皮生长因子 VEGF 和基质金属蛋白酶 MMP 在肿瘤的浸润与转移中起重要作用。

VEGF 又称血管通透因子,是目前已知的作用最强的促血管形成因子之一,也是肿瘤细胞分泌的血管形成因子中最重要的一种。VEGF 在肿瘤组织中高表达,不但促进肿瘤的血管生成,也促进了肿瘤的侵袭和转移,与多种肿瘤的发生、转移和预后密切相关^[1,2]。

基质金属蛋白酶(MMP)是近年来在研究细胞外基质合成与降解平衡中引起关注的一组酶,几乎能降解细胞外所有成分,MMP 在转移癌中明显高表达,与转移密切相关^[3]。其中基质金属蛋白酶-2(matrix metallo proteinase-2,MMP-2)能够特异的降解细胞外基质和基底膜的主要成分 IV 型胶原,被认为是在肿瘤侵袭转移过程中最直接和最重要的基质金属蛋白酶^[4]。

组织金属蛋白酶抑制剂 TIMP-2 是 MMP-2 的特异抑制因子^[5]。正常情况下,在机体内活化的 MMPs 和 TIMPs 之间存在一种平衡关系,正是这种平衡关系,决定 MMPs 的活性。如果这一平衡关系改变,将影响细胞间的浸润。

本研究发现,在大肠癌中 VEGF、MMP-2 与 TIMP-2 蛋白免疫染色阳性率较之正常组织明显增加,并均与肿瘤恶性程度、转移、Duke's 分期和五年存活率密切相关。进一步分析三者之间的相关性,发现在大肠癌组织中,VEGF、MMP-2 与 TIMP-2 三者之间的表达呈高度正相关。这表明,在大肠癌的发生发展和浸润转移过程中,VEGF 和 MMP-2 起着重要的作用,而且 VEGF 和 MMP-2 之间存在某种内在联系,两者相互协同,相互促进,在共同的

机制作用下,导致肿瘤的发展、浸润和转移。Zucker 等发现,肿瘤血管形成早期 VEGF 可诱导内皮细胞产生组织因子和基质金属蛋白酶,使凝血酶原转化成凝血酶,从而激活明胶酶原 A 降解原来的基膜,使细胞增殖^[6]。这与本文的观点是一致的。另外,TIMP-2 也与 VEGF 和 MMP-2 的表达呈正相关性,这可能是由于随着 MMP-2 在大肠癌的高表达,TIMP-2 也反馈性高表达,但却无法抑制 MMP-2 的作用。这一结果暗示 TIMP-2 对 MMP-2 的抑制作用有随大肠癌的恶化而减弱趋势。

由此可见,VEGF、MMP-2、TIMP-2 在肿瘤的恶性生物学行为中起重要作用,其高表达者肿瘤恶性程度高、易于转移,临床预后差;可作为判断肿瘤恶性程度和转移的一种生物学指标。

参考文献:

- [1] Brown LF, Berse B, Jackman RW, et al. Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract [J]. *Cancer Res*, 1993, 53 (19): 4727-4736.
- [2] Evelyne D, Patricia H, Aude V, et al. Tumor angiogenesis and tissue factor expression during the pancreatic carcinoma progression in a transgenic mouse model [J]. *J Hepatol*, 2003, 38 (6): 793-802.
- [3] Murray GI. Matrix metallo proteinases: a multifunctional group of molecules [J]. *J Pathol*, 2001, 195 (2): 135-137.
- [4] Loukopoulos P, Mungall BA, Straw RC, et al. Matrix metallo proteinase 2 and -9 involvement in canine tumors [J]. *Vet Pathol*, 2003, 40 (4): 382-394.
- [5] Worley JR, Thompson PB, Lee MH, et al. Sequence motifs of tissue inhibitor of metallo proteinases 2 (TIMP-2) determining progelatinase A (proMMP-2) binding and activation by membrane-type metalloproteinase 1 (MT1-MMP) [J]. *Biochem J*, 2003, 372 (3): 799-809.
- [6] Zucker S, Mirza H, Conner CE, et al. Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metallo proteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation [J]. *Int J Cancer*, 1998, 75 (5): 780-786.

(刘红武校对)