

基质金属蛋白酶-9 表达与胰腺癌生物学行为及预后的相关性研究 *

贾富鑫^{1,2} 张 东² 刘江伟^{2Δ} 李 鹏² 李建英³ 冯德元²

(1 石河子大学医学院 新疆 石河子 832000 ; 2 兰州军区乌鲁木齐总医院肝胆外科 新疆 乌鲁木齐 830000 ;

3 兰州军区乌鲁木齐总医院实验动物中心 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘要 目的 探讨基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)的表达与胰腺癌生物学特性及对患者预后的影响。方法 : 采用免疫组织化学法检测 63 例原发性胰腺癌及 11 例癌旁正常组织中 MMP-9 的表达,比较 MMP-9 的表达与胰腺癌患者生物学特性及预后的关系。结果 MMP-9 阳性表达率为 68.3%(43/63),而 11 例癌旁正常组织无 MMP-9 表达。MMP-9 的表达与肿瘤大小(P=0.014)、分化程度(P=0.039)、TNM 分期(P=0.001)、远处转移(P=0.011)及淋巴结转移(P=0.009)显著相关。MMP-9 表达阳性者生存时间明显低于阴性表达者(Log-rank 检验, $\chi^2=32.70$, P=0.000)。Cox 回归分析表明 :分化程度(P=0.000)、TNM 分期(P=0.006)、淋巴结转移(P=0.035)及 MMP-9 过表达(P=0.000)是胰腺癌预后的独立影响因素。结论 :MMP-9 过表达在胰腺癌的浸润转移中发挥重要作用,过表达提示预后不良,对 MMP-9 的检测可有效的评估胰腺癌患者的预后。

关键词 基质金属蛋白酶-9 胰腺癌 预后

中图分类号 :R735.9 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)08-1518-04

Correlation between MMP-9 Expression and Biological Behavior and Prognosis of Pancreatic Cancer*

JIA Fu-xin^{1,2}, ZHANG Dong², LIU Jiang-wei^{2Δ}, LI Peng², LI Jian-ying³, FENG De-yuan²

(1 Medical College of Shihezi University Shihezi Xinjiang 832000 China ;

2 Department of Hepatobiliary Surgery,Urumuqi General Hospital of Lanzhou Military region ;

3 Departmend of Animal Experimental Center,Urumuqi General Hospital of Lanzhou Military region Urumuqi 830000 China)

ABSTRACT Objective: To evaluate the relationship between expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and its biological characteristic, pognosis in pancreatic cancer patients. **Methods:** The expression of MMP-9 in 63 patients with pancreatic cancer and in 11 patients with the pancreatic tissue of noncarcinoma was examined by immunohistochemical methods. The expression of MMP-9 was compared with biological characteristics and prognosis of pancreatic cancer. **Results:** The positive expression rate of MMP-9 was 68.3% (43/63), and there was no expression of MMP-9 in adjacent normal pancreatic tissues. The expressions of MMP-9 were significantly correlated with tumor size (P=0.014), differentiation (P=0.039), TNM stages (P=0.001), distant metastasis (P=0.011) and lymph node metastasis (P=0.009). And the survival time of pancreaic cancer patients with the positive expression of MMP-9 was shorter than the negative expression(Log-rank test, $\chi^2=32.70$,P=0.000). The Cox regression showed that differentiation(P=0.000), TNM stages(P=0.006), lymph node metastasis (P=0.035), MMP-9 overexpression (P=0.000) were related with prognosis of pancreatic cancer patients. **Conclusion:** The overexpressions of MMP-9 proteins play important roles in proliferation and progression in pancreatic cancer, the overexpression of MMP-9 suggests the worse prognosis in pancreatic cancer. The examination of MMP-9 is useful in evaluating the prognosis of pancreatic cancer patients.

Key Words:matrix metalloproteinase-9; Pancreatic cancer; Prognosis

Chinese Library Classification(CLC): R735.9 **Document code:** A

Article ID:1673-6273(2011)08-1518-04

胰腺癌在所有消化道肿瘤中预后最差,而浸润和转移是导致死亡和影响预后的主要原因。破坏基底膜的完整是肿瘤浸润和转移的先决条件。基质金属蛋白酶(MMPs)是一系列生理情况下可降解细胞外基质及基底膜的内肽酶总称,其中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)可降解基底膜、型胶原、型胶原以及弹力蛋白,促使肿瘤细胞穿过基底膜屏障^[1,2],其作为专一性降基膜的酶越来越引起关注。本研究采用免疫组化二步法(PV法)检测了 63 例胰腺癌组织和 11 例癌旁正常胰腺组织中 MMP-9 的表

达,探讨其与临床病理因素及患者预后的关系。

1 材料及方法

1.1 临床资料

兰州军区乌鲁木齐总医院 2000 年 -2007 年外科手术切除存档的蜡块标本且经病理明确诊断为原发性胰腺导管腺癌 63 例。其中男性 39 例,女性 24 例;年龄 28~79 岁(平均年龄 61.1 岁)。高、中和低分化腺癌分别为 24 例、23 例和 16 例。按国际抗

* 基金项目 兰州军区医药卫生科研基金资助项目(LXH- 2005019)

作者简介 贾富鑫(1981-) 男,硕士研究生,研究方向:肝胆疾病。Tel:15276787306 E- mail:jiafuxin66@163.com

Δ通讯作者 刘江伟,博士后,主任医师,硕士生导师,研究方向:肝胆疾病及战创伤研究。Tel: 13999891506 E- mail: ljw273@sohu.com.

(收稿日期 2010- 11- 07 接受日期 2010- 12- 31)

癌联盟(UICC)制定的 TNM 分期进行临床病理分期。癌旁(距离癌灶至少 5cm 以上)处的正常组织 11 例。所有患者术前均未行放、化疗, 临床及病理资料完整。

1.2 免疫组化检测

兔抗人多克隆抗体基质金属蛋白酶 -9 (ZA-0336), 浓缩型,工作浓度为 1:50 ;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。标本常规石蜡包埋, 连续 4μm 厚度常规切片。除作常规 HE 染色外,余作免疫组化染色。步骤严格按照 PV 试剂盒的说明书操作。将已知 MMP-9 阳性切片作阳性对照, 用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.3 结果判断

每例切片在 400 倍镜下随机选取 5 个视野进行观察。MMP-9 阳性表达主要定位于细胞浆和(或)细胞膜, 反应物质呈棕黄色或棕褐色。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。

1.4 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。MMP-9 与临床病理因素关系的评估采用 χ^2 检验, Kaplan-Meier 法描绘生存曲线, 组间生存率比较用 Log-Rank 检验, 多因素 Cox 回归分析各预后因素的显著性, $P<0.05$ 表示有统计学意义。

表 1 MMP-9 的表达与胰腺癌临床病理因素的关系
Table 1 Correlation between MMP-9 expression and clinicopathological parameters in human pancreatic cancer

Clinicopathological parameters	cases	MMP-9 positive(%)	χ^2	P
Gender	Male	39	27(69.2%)	0.045
	Female	24	16(66.7%)	
Age(years)	<60	23	18(78.3%)	1.674
	≥ 60	40	25(62.5%)	
Tumor size(cm)	≤ 2	4	3(75.0%)	8.529
	2-4	41	23(56.1%)	
	>4	18	17(94.4%)	
Tumor location	head of pancreas	38	27(71.1%)	0.346
Body and tail	pancreas	25	16(64.0%)	
Differentiation	High	24	14(58.3%)	6.469
	Middle	23	14(60.9%)	
	Low	16	15(93.8%)	
TNM stage		8	4(50.0%)	15.791
		15	5(33.3%)	
		24	19(79.2%)	
		16	15(93.8%)	
Distant metastasis	Present	16	15(93.8%)	6.434
	Absent	47	28(59.6%)	
Lymph node metastasis	Present	37	30(81.1%)	6.808
	Absent	26	13(50.0%)	

Significance estimated with χ^2 test

2 结果

2.1 随访结果

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 5 例, 另有 2 例术后 3 个月内意外死亡计入失访, 失访率 11.1%。6 例依然存活(9.5%)。中位生

存时间为 11 个月, 1 年累计生存率为 39.3%。

2.2 免疫组织化学结果

MMP-9 表达主要定位于细胞浆和 (或) 细胞膜 (图 1), MMP-9 阳性者 43 例(68.3%) , 阴性者 20 例(31.7%)。11 例癌旁正常组织无 MMP-9 阳性表达(图 2)。MMP-9 的表达与肿瘤大小、分化程度、TNM 分期、远处转移及淋巴结转移显著相关, 见表 1。

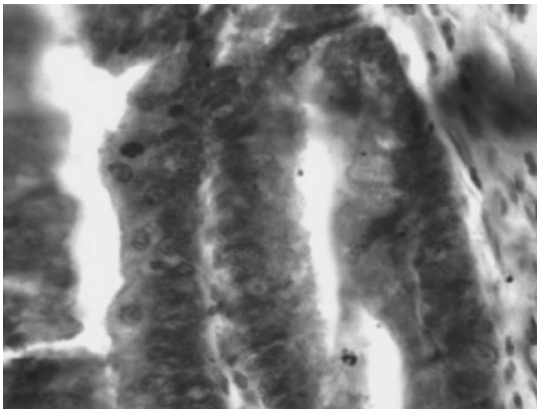


图 1 胰腺癌组织中 MMP-9 阳性表达(PVx400)

Fig.1 Positive expression of MMP-9 in pancreatic cancer tissue (PVx400)

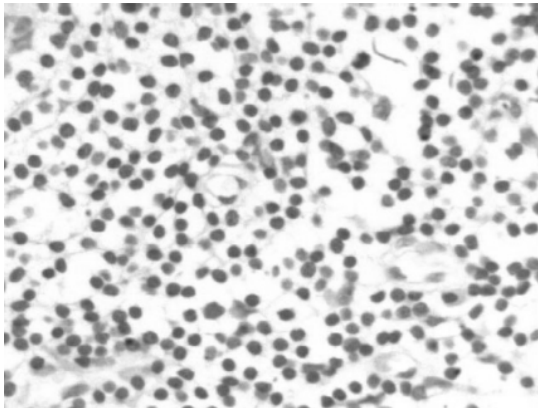


图 2 癌旁正常组织 MMP-9 阴性表达(PVx400)

Fig.2 Negative expression of MMP-9 in pancreatic tissue of noncarcinoma(PVx400)

2.3 MMP-9 的表达与患者预后的关系

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 2。生存曲线结果表明:MMP-9 阴性组胰腺癌患者的生存状况明显好于阳性组患者,差异有统计学意义(Log-rank 检验, $\chi^2=32.70$, $P=0.000$)。

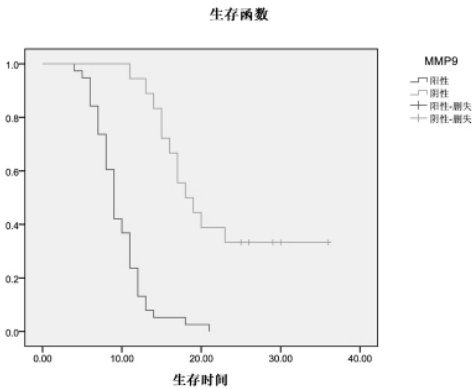


图 3 胰腺癌组织中 MMP-9 表达阳性与阴性组生存曲线

Fig 3 Survival curves of MMP-9 positive and negative expressions in pancreatic cancer

进一步将患者的肿瘤大小、分化程度、远处转移、淋巴结转移、TNM 分期及 MMP-9 蛋白表达等影响患者预后的可能因素强制引入 Cox 比例风险模型, 进行多因素分析 (回归模型的 $\chi^2=53.596$, $P=0.000$,模型具有意义),结果表明 分化程度($P=0.000$)、淋巴结转移($P=0.035$)、临床分期($P=0.006$)及 MMP-9 过表达($P=0.000$)为影响胰腺癌预后的独立因素,见表 2。

表 2 胰腺癌预后 Cox 比例风险模型分析结果

Tab 2 Multivariate analysis by Cox regression model on the prognosis of pancreatic cancer patients

	B	SE	Wald	df	Sig	Exp(B)	95%CIforExp(B)	
							Lower	Upper
MMP-9	-2.077	0.479	18.781	1	0.000	0.125	0.049	0.321
Differentiation	1.083	0.280	14.973	1	0.000	2.952	1.706	5.109
TNM stage	0.502	0.183	7.484	1	0.006	1.652	1.153	2.366
Lymph node metastasis	-0.782	0.370	4.469	1	0.035	0.458	0.222	0.945

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。MMPs 是 4 类降解细胞外基质的蛋白水解酶之一,其中 MMP-9 是 MMPs 中相对分子质量最大的酶,又名明胶酶-B,是 MMPs 家族成员之一,其一方面通过降解基底膜和包绕肿瘤的基质(型胶原),另一方面则通过新生血管生成等促进肿瘤生长和扩散,而促进肿瘤的浸润和转移^[3]。Han 等^[4]认为,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,使基底膜的完整性遭到破坏,促进肿瘤转移的发生。Jin 等^[5]发现,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高。Bodey 等^[6]研究证实乳腺癌、胃癌、卵巢癌、肺癌等都有 MMP-9 的过表达。本研究发现,胰腺癌中 MMP-9 阳性表达率为 68.3% ,MMP-9 的表达与 TNM 分期、远处转移、淋巴结转移、分化程度及肿瘤大小有明显相关性,与文献报道相符^[7-9] ,11 例癌旁正常组织未见 MMP-9 表达。研究表明 MMP-9 的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^[10]。

大量研究表明 MMP-9 的阳性表达与恶性肿瘤的进展及预后有关^[11,12]。Rollin J 等^[13]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。MMP-9在胰腺癌中的研究报道较少,且其与胰腺癌患者预后的研究未见文献报道。本文对胰腺癌组织中 MMP-9 的表达与生存时间进行比较,结果显示 MMP-9 表达阳性患者生存时间明显短于表达阴性的患者, MMP-9 的表达与生存时间有很大的关系,应用 Cox 回归分析性别、年龄、分化程度、临床分期、病理类型、MMP-9 的表达与胰腺癌患者的生存时间的关系,更进一步证明 MMP-9 的表达可以作为预测胰腺癌预后的一项指标。

综上所述, MMP-9 在胰腺癌中的表达与临床生物学特性密切相关, MMP-9 蛋白的免疫组化表达状况可作为胰腺癌患者预后的有效预测指标。MMP-9 蛋白的阳性表达意味着肿瘤复发、转移可能性的增加和总生存率的下降。根据 MMP-9 在胰腺癌组织中表达而在正常组织中不表达的特性,有望成为胰腺癌治疗的新靶点。

参考文献(References)

- [1] Yu Q, Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis [J]. *Genes Dev*, 2000, 14(2): 163-176
- [2] Somiari SB, Shriver CD, Heckman C, et al. Plasma concentration and activity of matrix metalloproteinase-2 and-9 in patients with breast disease, breast cancer and at risk of developing breast cancer [J]. *Cancer Lett*, 2006, 233(1): 98-107
- [3] YAO J, XIONG S, KLOSK, et al. Multiple signaling pathways involved in activation of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) by heregulin beta1 in human breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2001, 20: 8066
- [4] Han S, Ritzenthaler JD, Sitaraman SV, et al. Fibronectin increases matrix metalloproteinase-9 expression through activation of c-Fos via extracellular-regulated kinase and phosphatidylinositol3-kinase pathways in human lung carcinoma cells [J]. *JBiolChem*, 2006, 281(40): 29614-29624
- [5] Jin JS, Hsieh DS, Lin YF, et al. Increasing expression of extracellular

matrix metalloproteinase inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters [J]. *Int J Urol*, 2006, 13(5): 573-580

- [6] Bodey B, Bodey JB, Siegel SE, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinase expression in colorectal carcinomas. *In Vivo*, 2000, 14: 659-666
- [7] 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 [J]. *临床消化病杂志*. 2006, 18(4): 216-218
- XIAO Min, CHEN Jie, YU X iao-yun, et al. Angiopoietin-2, MMP-9 and TIMP-1 Expressions in Pancreatic Cancer and Their Relations to Invasiveness and Metastasis [J]. *Chinese Journal of Clinical Gastroenterology*, 2006, 18(4): 216-218
- [8] Senota A, Itoh F, Yamamoto H, Adachi Y, et al. Relation of matrix metalloproteinase-9 expression with invasive activity in human gastric cancer [J]. *Clin Exp Metastasis*, 1998, 16: 313-321
- [9] Koumura H, Sugiyama Y, Kunieda K, et al. Significance in gene expression of matrix metalloproteinase-9, urokinase-type plasminogen activator and tissue inhibitor of metalloproteinase for metastases of gastric and/or colorectal cancer [J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1997, 24(2): 324
- [10] Tang ZY. Studies on small pancreatic carcinoma clinical aspect and molecular biology [J]. *Hepatol Rapid Literat Rev*, 1996; 26: 11
- [11] Rao JS, Gondi C, Chetty C, et al. Inhibition of invasion, angiogenesis, tumor growth, and metastasis by adenovirus mediated transfer of antisense uPAR and MMP-9 in non-small cell lung cancer cells [J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(9): 1399-1408
- [12] Tummala P, Spomander 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 [J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(5): 1039-1050
- [13] Rollin J, Regina 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 [J]. *Lung cancer*, 2007, 56(2): 273-280

(上接第 1494 页)

- [25] Gagner M. Value of preoperative physiologic assessment in outcome of patients undergoing major surgical procedures [J]. *Surg Clin North Am*. 1991; 71(6): 1141-50
- [26] Marks RJ, Simons RS, Blizard RA, et al. Predicting outcome in intensive therapy units—a comparison of Apache II with subjective assessments [J]. *Intensive Care Med*. 1991; 17(3): 159-63
- [27] Wang BW, Mok KT, Chang HT, et al. APACHE II score: a useful tool for risk assessment and an aid to decision-making in emergency operation for bleeding gastric ulcer [J]. *J Am Coll Surg*. 1998; 187(3):

287-94

- [28] Angus DC, Clermont G, Kramer DJ, et al. Short-term and long-term outcome prediction with the Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II system after orthotopic liver transplantation [J]. *Crit Care Med*, 2000; 28(1): 150-6
- [29] Soares M, Fontes F, Dantas J, et al. Performance of six severity-of-illness scores in cancer patients requiring admission to the intensive care unit: a prospective observational study [J]. *Crit Care*, 2004, 8(4): R194-203