

C-erBb-2、MMP-9 在结直肠癌中的表达及相关意义

潘亿文 何娟 陈胜林 侯国庆 李威[△]

(广东省汕头大学附属第一医院 广东 汕头 515041)

摘要 目的:探讨 C-erBb-2、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在结直肠癌中的表达与其浸润转移的关系,寻找浸润转移的客观指标及可能相关机制。方法:用免疫组化法测定 80 例结直肠癌组织中 C-erBb-2 和 MMP-9 的表达情况。结果:①C-erBb-2、MMP-9 在结直肠癌组织中阳性表达率 60.0 % (48/80)和 56.2 % (45/80)。②在有淋巴结转移的结直肠癌组织中 C-erBb-2、MMP-9 阳性率分别为 75.0 % (30/40)、72.5 % (29/40),高于无淋巴结转移的结直肠癌组织中的 C-erBb-2、MMP-9 阳性率 45 % (18/30)、40.0 % (16/40) ($P < 0.05$);③二者共同阳性者淋巴结转移率为 78.1 % (25/32),高于二者均阴性者淋巴结转移率 26.3 % (5/19) ($P < 0.05$);④C-erBb-2、MMP-9 联合表达存在意义,且为正相关($r=0.257, P < 0.05$)。⑤C-erBb-2、MMP-9 的表达与肿瘤的大小、性别、年龄、浸润层次等因素无关,但与肿瘤分期、淋巴结转移、分化有关。结论:C-erBb-2、MMP-9 表达与淋巴结转移密切相关,二者在有淋巴结转移的结直肠癌组织中表达可能存在协同作用,可作为临床检测淋巴结转移的重要指标之一。

关键词 结直肠肿瘤; C-erBb-2; 基质金属蛋白酶-9; 免疫组化; 浸润转移

中图分类号 R735.34 **文献标识码** A **文章编号** 1673-6273(2012)01-90-04

The Expression of C-erBb-2 and MMP-9 in Primary Colorectal Cancer and Clinical Significance

PAN Yi-wen, HE Juan, CHEN Sheng-lin, HOU Guo-qing, LI Wei[△]

(The First Affiliated Hospital to Shantou University, Shantou, Guangdong, China, 515041)

ABSTRACT Objective: To investigate the expression of C-erBb-2 and MMP-9 in colorectal carcinoma and their relationship with lymph node transfer, and to investigate the transfer mechanism and the objective target. **Methods:** Immunohistochemical method was used to detect the expression of C-erBb-2 and MMP-9 in colorectal cancer tissues. **Results:** ①The positive rates of C-erBb-2 and MMP-9 in tissues were 60.0 % (48/80) and 56.2 % (45/80). ②The positive rates of C-erBb-2 and MMP-9 that with lymph node transfer were 75.0 % (30/40) and 72.5 % (29/40) which were higher than that with no lymph node transfer (the corresponding rates were 45 % (18/40) and 40.0 % (16/40)) ($P < 0.05$). ③Two common positive rates with lymph node transfer were 78.1 % (25/32), which was higher than both negative (26.3 % (5/19)) ($P < 0.05$). ④The expression of C-erBb-2 and MMP-9 jointly existed significance, and there were positive correlations ($r=0.257, P < 0.05$). ⑤The expression of C-erBb-2 and MMP-9 had no relationship with the sizes of the tumor, gender and age, but had relationship with the lymph node transfer, differentiation and clinical stages. **Conclusion:** The expression of C-erBb-2 and MMP-9 had closely relationship with lymph node transfer in colorectal carcinoma, and the roles might synergetic, which could be used as one of the important clinical evidence that colorectal carcinoma with lymph node transfer.

Key words: Colorectal carcinoma; C-erBb-2; MMP-9; Immunohistochemistry; Metastasis

Chinese Library Classification (CLC): R735.34 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)01-90-04

前言

结直肠癌(colorectal carcinoma, CRC)是全世界最常见恶性肿瘤之一,近年来发病率呈明显的上升趋势。而浸润转移及局部复发是结直肠癌患者死亡的主要原因,一旦发生浸润转移,预后及差,5 年生存率低,其发生发展是多因素、多阶段进展复杂的生物学过程,目前还不能得到完整解释,对于结直肠癌目前采用以手术切除为主的综合性治疗,5 年生存率虽有所提高,但依然不容乐观。想要提高 5 年生存率及彻底治愈此类疾病,必须尽早发现其脉管转移,并完整清除原发肿瘤及脉管

内转移的肿瘤细胞。

C-erBb-2 或称为 Neu 或 HER-2,定位于 17 号染色体,编码分子量为 185 KD 穿膜蛋白,与表皮生长因子(EGFR)同源,具有抑制络氨酸激酶活性,过度表达见于多种肿瘤,其活化机制主要是基因突变、基因扩增及基因产物过度表达,其活化参与多种实体瘤发生,并与其浸润转移、预后有关^[1]。MMP-9 又称明胶酶 B,为一种蛋白水解酶,主要功能是降解细胞外基质,如明胶和 IV/V 型胶原,促使肿瘤细胞发生浸润转移,人类基因组中目前尚未发现 MMP-9 缺陷,但发现 MMP-9 基因有多个多态性位点与结直肠癌生物学行为密切相关,其加快肿瘤细胞侵袭转移^[2]。有关于 C-erBb-2 和 MMP-9 在结直肠癌中相互作用研究鲜有报道,本实验采用免疫组化法对其在结直肠癌中表达进行相关研究,以初步探讨他们在结直肠癌中表达情况及其临床意义。

作者简介:潘亿文(1983-)男,硕士研究生,主要研究方向:胃肠道肿瘤的基础及临床。电话:13546875177 E-mail: stdxpyw@163.com

[△]通讯作者:李威 E-mail: lwmail@medmail.com.cn

(收稿日期:2011-07-20 接受日期:2011-08-15)

1 材料与方法

1.1 临床资料

收集汕头大学附属第一医院 2010 年 1 月-2011 年 5 月期间手术切除结肠癌标本 80 例,均经过病理确诊。其中男性 44 例,女性 36 例,年龄 24-81 岁,平均年龄 48.3 ± 2.3 岁,所有患者术前未行辅助化疗及放疗。80 例原发性结肠癌患者中,40 例发生淋巴结转移,所有标本均常规取材,10 % 福尔马林液固定,常规石蜡包埋,切片约厚 $4 \mu\text{m}$ 。

1.2 方法

采用 MaxVisionTM(即用型快捷免疫组化一步法),鼠抗人 C-erbB-2 单克隆抗体、鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体和免疫组织化学染色试剂盒均购于福州迈新生物技术有限公司。以试剂公司所提供的阳性切片作阳性对照,PBS(磷酸盐缓冲液)代替一抗作阴性对照,DAB(聚合法)显色。

1.3 结果判断

免疫组化染色切片采用光学显微镜观察,随机选择 5 个视野,每个视野计数一百个细胞,由两个专业病理医师进行读片,C-erbB-2、MMP-9 分别主要表达定位于细胞膜及细胞质,被染成棕色或棕黄色,阳性判断标准均采用 FDA 推荐的 Hercept

Test^[3]评分方法 (-)为无细胞染色或 <30 % 的肿瘤细胞细胞膜或质较弱染色;(+) 为 $\geq 30\%$ 的肿瘤细胞细胞膜或质部分较弱染色;(++)为 $\geq 30\%$ 的肿瘤细胞细胞膜或质完全较弱到中等染色;(+++)为 $\geq 30\%$ 的肿瘤细胞细胞膜或质完全强染色。

1.4 统计学处理

统计学分析采用 SPSS16.0 软件处理,计数资料组间比较采用 χ^2 检验,相关性分析采用 Spearman 法。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 C-erbB-2 和 MMP-9 在结肠癌组织中表达及分布

C-erbB-2 主要表达于细胞膜上,被染成棕色(图 1),MMP-9 主要表达于细胞质中,被染成棕黄色(图 2),在 80 例结肠癌组织中,C-erbB-2 阳性率 60.0 % (48/80),MMP-9 阳性率为 56.2 % (45/80),两者无统计学差异。C-erbB-2 和 MMP-9 共同阳性者 40 % (32/80)。40 例发生脉管转移的结肠癌中,二者共同阳性表达者为 62.5 % (25/40),40 例未转移结肠癌中仅有 7 例 (17.5 %) 出现两者共同阳性表达,有统计学意义($P < 0.05$)。

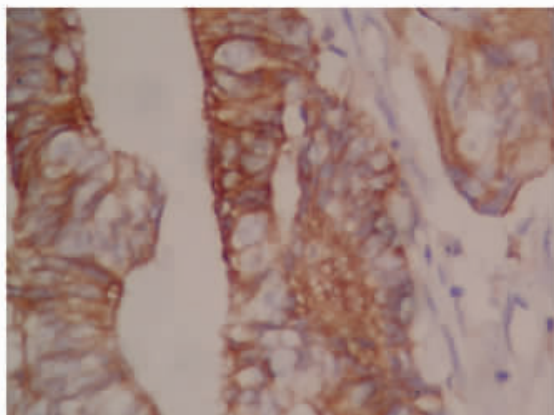


图 1 C-erbB-2 在结肠癌中的表达($\times 400$)

Fig. 1 The expression of C-erbB-2 in colorectal cancer tissues($\times 400$)

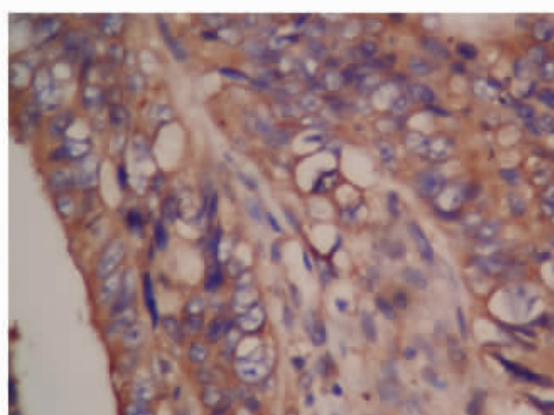


图 2 MMP-9 在结肠癌中的表达($\times 400$)

Fig.2 The expression of MMP-9 in colorectal cancer tissues($\times 400$)

2.2 C-erbB-2 和 MMP-9 表达与结肠癌临床病理特征的关系

C-erbB-2、MMP-9 表达与患者性别、年龄、肿瘤大小、部位、浸润层次差异均无统计学意义,但与淋巴结浸润转移、分化程度及分期差异有统计学意义($P < 0.05$)(表 1)。

2.3 C-erbB-2 和 MMP-9 在结肠癌组织中表达的相关性

80 例结肠癌组织中,32 例 C-erbB-2 和 MMP-9 同时阳性者中有 25 例 (78.1 %) 发生脉管转移,与二者均阴性转移率 (3/19,15.8 %) 者比较有统计学意义 ($P < 0.05$)。有脉管转移但 C-erbB-2、MMP-9 没有共同表达的 12 例中,7 例 C-erbB-2 单独表达阳性,4 例 MMP-9 单独表达阳性,1 例两者均阴性。双变量相关分析显示,结肠癌组织中的 C-erbB-2 表达与 MMP-9 表达呈正相关($r=0.257, P < 0.05$)(表 2)。

3 讨论

C-erbB-2 基因产物属于表皮生长因子受体(EGFR)家族,

家族成员还有 ERBB1、ERBB3、ERBB4,能与受体特异性结合,发生二聚体化激发受体交叉磷酸化。Xu KP 等研究发现血管内皮生长因子受体(VEGF)可刺激 C-erbB-2 酪氨酸磷酸化,引起相关基因激活,导致细胞增殖失控,表明 C-erbB-2 在一系列酪氨酸磷酸化中起关键作用,而磷酸化为细胞增殖关键步骤^[4]。其编码的 P185 蛋白作为一种受体酪氨酸激酶(receptor tyrosine kinase, RTK),可接受胞外配体 EGRF 刺激信号,并将信号导入胞质中,导致正常细胞肿瘤化,此外其还可通过 Ras/MAPK(分裂素活化蛋白激酶)途径活化转录调控因子(transformation-specific Ets)家族成员雌激素受体 81(estrogen receptor, ER81)上调末端转移酶逆转录酶(hTERT),引起其异常活化,使细胞转化并进入永久增殖状态^[5]。因此其即可促进肿瘤血管生成同时又能激活肿瘤细胞分裂,此外 C-erbB-2 还参与肿瘤转移免疫逃避,研究证实 C-erbB-2 可通过 PI3K(磷脂酰肌醇-3 激酶)-PKB(蛋白激酶 B)/Akt 途径调控环氧合酶-2(COX-2)基

因 ,而该基因激活后能明显抑制肿瘤细胞凋亡^[6] ,此外 C-erBb-2 还可通过 Ras/MAPK 途径激活 Smad7 的启动子 ,激活后其与 TGF-β(转化生长因子)I 型受体结合,抑制 TGF-β 抗细胞增殖的作用^[7]。Smad7 高表达可使细胞逃避抗生长信号而免于凋亡。本实验研究发现,在发生脉管转移的结直肠癌组织中 C-erBb-2 阳性表达率显著高于无脉管转移的结直肠癌组织中的阳性表达率 ,提示 C-erBb-2 高表达与肿瘤脉管转移可能存在一定关

系 ,同时也发现 C-erBb-2 阳性表达与肿瘤大小、性别及年龄无相关性。Kapitanovic S 等通过免疫组化方法证实 C-erBb-2 基因表达与生存期有关 ^[8] ,park DI 等研究证实 C-erBb 过表达的结直肠癌患者术后复发率明显高于无 C-erBb-2 过表达(39.3 % vs 14.6 % ,P=0.013) ,5 年生存率明显降低^[9]。因此 C-erBb-2 又被认为是结直肠癌预后一个独立预后因子^[10]。结直肠癌侵袭和转移是其致死的主要原因之一,肿瘤细胞

表 1 结直肠癌中 C-erBb-2 和 MMP-9 的表达与临床参数关系
Table 1 Relationship between the expression of C-erBb-2 and MMP-9 and the clinical parameters

The Clinical Parameters	N	C-erBb-2 +(%)	X ²	P value	MMP-9 +(%)	X ²	P value
Gander							
Male	44	25(56.8)	0.412	0.910	30(68.2)	0.015	0.904
Female	36	23(63.9)			25(69.4)		
Age							
<50	20	11(55.0)	0.278	0.598	12(60.0)	0.152	0.696
≥50	60	37(61.7)			33(55.0)		
Diameter of the tumor							
<5cm	56	33(58.9)	0.089	0.765	29(51.8)	1.512	1.512
≥5cm	24	15(62.5)			16(61.7)		
Location							
Colon	43	25(58.1)	0.134	0.714	25(58.1)	0.135	0.713
Rectum	37	23(62.2)			20(54.1)		
Depth of infiltration							
Serous layer above	9	7 (77.8)	1.706	0.191	6 (66.7)	0.010	0.922
Serous layer below	71	39(55.9)			39(65.0)		
The lymph node transfer							
Positive	40	30(75.0)	7.500	0.006	29(72.5)	8.584	0.003
Negative	40	18(45.0)			16(40.0)		
The differentiation							
The high and middle differentiation	67	37(55.2)	3.919	0.048	34(52.7)	5.075	0.024
The low differentiation	13	11(84.6)			11(84.6)		
The stage							
Stage I and II	37	17(45.9)	5.665	0.017	14(37.8)	9.483	0.002
Stage III and IV	43	31(72.1)	0.017		31(72.1)		

表 2 结直肠癌组织中的 C-erBb-2 表达与 MMP-9 表达相关性
Table 2 The relevance between C-erBb-2 and MMP-9 in colorectal canceroma tissues

Group	C-erBb-2	
	(+)	(-)
MMP-9(+)	32	13
MMP-9(-)	16	19

及其间质基底膜是浸润转移的一道天然屏障。正常基底膜主要由 Ⅰ型胶原形成致密网状结构,不允许正常固有细胞通过,而

MMP-9 作为降解 Ⅰ型胶原最主要的酶之一 ,肿瘤细胞发生脉管转移的主要步骤之一是肿瘤细胞突破细胞基底膜及细胞外

间质,MMP-9降解型胶原后,肿瘤细胞便可沿溶解缺失的基质间隙向四周组织侵袭转移^[11]。因此,MMP-9被认为与肿瘤的侵袭和转移密切相关。同时研究证实MMP-9还可促进毛细血管内新生血管生成,为肿瘤细胞提供生长必需营养及生长因子,从而间接为肿瘤细胞浸润转移提供基础^[12]。本实验发现,在发生脉管转移的结直肠癌组织中MMP-9蛋白阳性表达率为72.5%,显著高于无转移的结直肠癌组织(40%),提示MMP-9在结直肠癌发生转移过程中发挥重要作用,同时发现MMP-9阳性表达与肿瘤大小、性别、年龄及浸润层次无相关性。但与肿瘤分期、分化有关,提示低分化腺癌更容易发生脉管转移,且分期越晚,预后越差,其结论与戴小平结论基本一致^[13]。

过去研究一直认为,C-erbB-2及MMP-9基因在肿瘤发生发展过程中相互独立,但近来研究表明其可能存在某种关系,C-erbB-2能上调VEGF,从而促进肿瘤血管生成及肿瘤生长,同时研究证实高表达MMP-9伴随血管生成素-2(Ang-2)上调,诱发新生血管的生成^[14]。此外还有研究证实C-erbB-2还可激活VEGF启动子而增加其mRNA和蛋白水平的表达^[15]。研究显示COX-2与MMP-9表达呈正相关,但具体机制不详,猜测可能是COX-2通过上调MMP-9的表达来促使肿瘤细胞侵袭转移^[16]。本实验发现,C-erbB-2表达与MMP-9表达呈正相关($r=0.257$, $P<0.05$),猜测可能是C-erbB-2作为COX-2上游调控基因,通过调控COX-2表达水平来间接调控MMP-9表达水平,或MMP-9是否能通过正反馈C-erbB-2,来上调C-erbB-2再调控MMP-9表达,目前还没有得到证实,且缺少相关实验研究,有待进一步实验证实。

本研究通过检测C-erbB-2和MMP-9在结直肠癌组织中表达情况来探讨其可能关系。发现二者对于结直肠癌细胞发生脉管转移可能存在一定的关系,而脉管转移与预后明显相关,表明C-erbB-2和MMP-9能够预测结直肠癌预后,可能成为结直肠癌预后参照重要指标之一。所以C-erbB-2和MMP-9不仅可能成为临床诊断及预后,也可作为新的潜在干预靶点,进而进一步有效降低肿瘤自身生物学行为,提高患者5年生存率,有一定的临床意义,但需进一步的实验研究证实其进一步可能关系,为临床提供相关干预靶点提供实验依据。

参考文献(References)

- [1] Riou G, Mathieu MC, Barrois M, et al. C-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification is a better indicator of poor prognosis than protein over-expression in operable breast-cancer patients [J]. *Int J Cancer*, 2001,95(4):266-270
- [2] Tang Y, Zhu JZ, Chen L, et al. Associations of matrix metalloproteinase-9 protein polymorphisms with lymph node metastasis but not invasion of gastric cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(9):2870-2877
- [3] Ellis IO, Dowsett M, Bartlett J, et al. Recommendations for HER-2 testing in the UK [J]. *Clinical Pathology*, 2000, 53(12):890-892
- [4] Xu KP, Riggs A, Ding Y, et al. Role of erbB2 in corneal epithelial wound healing[J]. *Invest phthamoe is Sci*, 2004,45(12):4277-4283
- [5] Goueli BS, Janknecht R. Up-regulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu,Ras, or Raf[J]. *Mole Cell Bio*,2004,24(1):25-35
- [6] Wang SC, Lien HC, Xia W, et al. Binding at and transactivation of the COX-2 promoter by nuclear tyrosine kinase receptor ErbB-2[J]. *Cancer Cel*, 2004, 6(1):251-261
- [7] Dowdy SC, Mariani A, Janknecht R. HER2/neu and TAK1-mediated up-regulation of the transforming growth factor beta inhibitor Smad7 via the ETS protein ER81[J]. *Biol Chem*, 2003,(45) 278:44377-44384
- [8] Kapitanovic S, Radosevic S, Kapitanovic M, et al. The expression of P185 HER-2/neu correlation with the stage of disease and survival in colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*,1997,112(4):1103-1113
- [9] Park DI, Yun JW, Park JH, et al. Her-2/neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer [J]. *Dig Dis Sci*,2006,51 (8): 1371-1379
- [10] 钱露,郭宁.原癌基因HER2转录调控的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005,12(3):228-231
Qian Lu, Guo Ning. Update on transcription regulation of pro-oncogenic HER2 [J]. *Chin Canc Bio*, 2005, 12(3):228-231(In Chinese)
- [11] 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
- [12] 柳海,李秀,吴强,等.口腔鳞状细胞癌中MMP-9,CD44v6表达及其意义[J]. *中国肿瘤*,2005,14(11):747-750
Liu Hai, Li Xiu, Wu Qiang, et al. The expression of matrix metalloproteinase-9 and CD44 splice variant 6 in oral squamous cell carcinoma and its significance[J]. *Chin Canc*,2005,14(11):747-750(In Chinese)
- [13] 戴小平,舒国顺.结直肠癌EMMPRIN,MMP1,和MMP9表达及临床病理意义[J]. *临床医学研究*, 2003, 30(12):889-891
Dai Xiao-ping, Shu Guo-shun. EMMPRIN, MMP1 and MMP9 in the colorectal cancer tissues and their clinicopathological significance [J]. *Clin Rese*, 2003, 30(12):889-891(In Chinese)
- [14] Das A, Fanslow W, Cerretti D, et al. Angiopoietin/Tek Interactions regulate mmp-9 expression and retinal neovascularization [J]. *Lab Invest*,2003,83:1637-1645
- [15] Finkenzeller G, Weindel K, Zimmermann W, et al. Activated Neu/ErbB-2 induces expression of the vascular endothelial growth factor gene by functional activation of the transcription factor Sp1. *Angiogenesis* [J]. *Bio Chem*, 2004, 7:59-68
- [16] 王俊萍,于雁. MMP-9与胃癌侵袭转移研究进展[J]. *实用肿瘤学杂志*,2007,21(5):471-474
Wang Jun-ping, Yu Yan. MMP-9 and gastric cancer metastasis research progress[J]. *Prac Canc*, 2007, 21(5)471-474 (In Chinese)