

MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达在肝移植后肿瘤复发与转移预测中的价值研究*

郭晓东 李捍卫 张 敏 熊 璐 梁 丽 马雪梅 赵景民[△]

(解放军第 302 医院 北京 100039)

摘要 目的 探讨 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达在预测肝癌肝移植后肿瘤复发与转移中的价值。方法 选择肝癌行全肝移植患者 85 例,应用免疫组化方法检测其切除的肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达,并对患者进行移植术后随访,观察术后肝癌复发与转移情况。分析 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达与移植后肝癌复发与转移之间的关系和意义。结果 肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 及 P53 阳性表达率均明显高于癌旁组织($P<0.01$)。MMP-2 表达与肝癌肿瘤直径、TNM 分期、病理分级及门静脉癌栓显著相关性($P<0.05$), MMP-9 表达与肝癌肿瘤直径、TNM 分期、门静脉癌栓及肿瘤包膜显著相关性($P<0.05$)。P53 表达与肝癌肿瘤直径、门静脉癌栓及肿瘤包膜显著相关性($P<0.05$)。MMP-2、MMP-9 在未复发和转移组中的表达明显低于复发和转移组($P<0.05$),而 P53 在两组间的表达差异无显著性($P>0.05$)。肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 高阳性表达均是预测肝癌患者肝移植后肿瘤复发和转移的独立预见因子,而 P53 未显示其具有预测意义。结论 MMP-2、MMP-9 及 P53 在肝癌组织中呈高表达, MMP-2、MMP-9 的表达水平可以有效预测肝癌患者肝移植后肿瘤复发和转移。

关键词 肝肿瘤 肝移植 复发 转移 基质金属蛋白酶 P53

中图分类号 R735.7 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2011)01-90-04

Value of expression of MMP-2, MMP-9 and P53 in forecast of tumor recurrence and metastasis after liver transplantation*

GUO Xiao-dong, LI Han-wei, ZHANG Min, XIONG Luo, LIANG Li, MA Xue-mei, ZHAO Jing-min

(302 Hospital of PLA, Beijing 100039, China)

ABSTRACT Objective: To explore the value of the expression of MMP-2, MMP-9 and P53 in the tumor recurrence and metastasis after liver transplantation. **Methods:** We chose 85 hepatic cancer patients with total liver transplantation, and detected the expression of MMP-2, MMP-9 and P53 in the tissues of hepatic cancer by using immunohistochemistry. Meanwhile, we followed up these patients with liver transplantation, and observed the tumor recurrence and metastasis after liver transplantation. The relation and significance of MMP-2, MMP-9 and P53 in the tumor recurrence and metastasis after liver transplantation was analyzed. **Results:** Compared with adjacent tissues, the rate of positive expression of MMP-2, MMP-9 and P53 was significantly increased. The expression of MMP-2 had obviously correlation with tumor diameter, staging of TNM, pathological grade and portal vein tumor thrombus ($P<0.05$). The expression of MMP-9 had obviously correlation with tumor diameter, staging of TNM, portal vein tumor thrombus and tumor capsule ($P<0.05$). The expression of P53 had obviously correlation with tumor diameter, portal vein tumor thrombus and tumor capsule ($P<0.05$). Compared with group of recurrence and metastasis, the expression of MMP-2 and -9 in the group of none recurrence and metastasis was significantly lower ($P<0.05$), and there was no significant between two groups about the expression of P53 ($P>0.05$). The high positive expression of MMP-2 and -9 in the tumor tissues were the independently predicted factors in the forecast of tumor recurrence and metastasis in the hepatic cancer patients with liver transplantation, but not P53 gene. **Conclusion:** The expression of MMP-2, MMP-9 and P53 in the hepatic cancer tissues was increased and had a valuable forecast for the tumor recurrence and metastasis in the hepatic cancer patients with liver transplantation.

Key words: liver cancer; liver transplantation; recurrence; metastasis; MMP; p53

Chinese Library Classification(CLC): R735.7 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)01-90-04

1963 年 starz 成功完成第一例肝移植,经过 40 多年的发展,肝移植技术及围手术期处理逐渐成熟,越来越多的肝癌患者接受肝脏移植。肝移植治疗肝癌切除了整个病肝,不但最大程度地切除了肿瘤,而且去除患有肝炎、肝硬化等易滋生肿

瘤的病肝,理论上降低了手术后肿瘤再发和转移的风险,但临床经验表明移植肝癌复发和转移导致患者不能长期生存的病例仍然较多,直接影响到肝癌肝移植的疗效^[1-2]。因此明确肝癌肝移植术后复发和转移的机制和规律,探讨早期评估与动态预

* 基金项目 解放军第 302 医院院内课题(2009007 号)

作者简介 郭晓东(1981-)主治医师 研究方向 肝病诊断与治疗 联系方式:13911161582

[△]通讯作者 赵景民(1964-)主任医师 教授 研究方向 肝病病理、肝移植病理与传染病病理 联系方式 010-66933259

(收稿日期 2010-10-30 接受日期 2010-11-22)

测移植术后肿瘤复发和转移的生物学指标,摸索出有效预防和治疗方法,对制定有效的预防和治疗方案、改善患者预后具有重要的临床意义。

1 材料与方法

1.1 标本来源

本组标本来源于 2005 年 6 月~2010 年 6 月我院肝脏移植中心施行肝癌全肝移植的手术切除标本 85 例,每一例标本分别取癌组织、癌旁组织。所有病例均符合原发性肝癌临床诊断标准^[2],术前后均未接受放疗、化疗或其他治疗。其中男 73 例,女 12 例,年龄 42.9±7.5 岁(28~65 岁),中位年龄 52 岁,病理分级按 2000 年 WHO 分级: ~ 级 33 例, ~ 级 51 例;临床分期按 1977 年 TNM 分期: ~ 级 40 例, ~ a 级 45 例。术后随访患者 5~36 个月,收集记录所有患者完整的随访资料。

1.2 免疫组织化学检测

所有标本均经过 10%甲醛固定,石蜡包埋,4μm 厚连续切片。采用链菌素抗生物素-过氧化物酶法(SP)检测 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达。鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体、MMP-9 多克隆抗体、突变型 P53 单克隆抗体均购自美国 PTG 公司,通用型 SP 二抗试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中山生物技术有限公司。操作程序严格按照说明书进行。阴性对照以 PBS 替代一抗,用已知阳性标本作阳性对照。

1.3 结果判断

MMP-2、MMP-9 及 P53 染色均以肿瘤细胞出现棕黄色颗粒、且着色强度高于背景非特异染色者判定为阳性信号。MMP-2、MMP-9 定位于肿瘤细胞胞浆和(或)细胞膜,P53 定位于肿瘤细胞核。根据染色强度和阳性细胞数进行综合评分,染色强度:1 分,染色弱但明显强于阴性对照;2 分,染色清晰,中等

程度;3 分,染色程度强。阳性细胞数:1 分,阳性细胞占 11~50%;2 分,阳性细胞占 51~80%;3 分,阳性细胞≥81%。上述两项积分相加,0 分为(-),1~2 分为(+),3~4 分为(++),5~6 分为(+++)。(-)和(+)为阴性,(++)和(+++)为阳性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件并进行统计分析,计数资料多个样本率的比较和两个样本率之间的比较采用卡方检验,肿瘤分子标志物独立预测复发和转移的价值采用多因素 Cox 回归分析。以 P<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-2、MMP-9 及 P53 在肝癌和癌旁组织的表达

85 例肝癌组织中,MMP-2 表达阳性有 67 例,阳性率为 78.8%;MMP-9 表达阳性有 53 例,阳性率为 62.4%;P53 表达阳性有 44 例,阳性率为 51.8%。对应 85 例癌旁组织中,MMP-2 表达阳性有 21 例,阳性率为 24.7%;MMP-9 表达阳性有 13 例,阳性率为 15.3%;P53 表达阳性有 8 例,阳性率为 9.4%。肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 及 P53 阳性表达率均明显高于癌旁组织(P<0.01)。

2.2 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达与肝癌临床病理学参数的相关性

MMP-2 表达与肝癌肿瘤直径、TNM 分期、病理分级及门静脉癌栓显著相关性(P<0.05),而与肝癌其他临床病理学参数无相关性(P>0.05)。MMP-9 表达与肝癌肿瘤直径、TNM 分期、门静脉癌栓及肿瘤包膜显著相关性(P<0.05),而与肝癌其他临床病理学参数无相关性(P>0.05)。P53 表达与肝癌肿瘤直径、门静脉癌栓及肿瘤包膜显著相关性(P<0.05),而与肝癌其他临床病理学参数无相关性(P>0.05),见表 1。

表 1 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达与肝癌临床病理学参数的相关性 n(%)
Table 1 The correlation between the expression of MMP-2, MMP-9 and P53 and hepatic cancer clinicopathological parameters n(%)

临床病理因素 clinicopathological factors	n	MMP-2 表达阳性率 the rate of positive expression of MMP-2	MMP-9 表达阳性率 the rate of positive expression of MMP-9	P53 表达阳性率 the rate of positive expression of P53
性别 gender				
男 male	73	58(79.5)	46(63.0)	38(52.1)
女 female	12	9(75.0)	7(58.3)	6(50.0)
年龄(岁) age (years)				
≤ 60	75	59(78.7)	47(62.7)	39(52.0)
> 60	10	8(80.0)	6(60.0)	5(50.0)
肝功能分级 grading of liver function				
A	48	38(79.2)	30(62.5)	25(52.1)
B	27	21(77.8)	17(62.9)	14(51.9)
C	10	8(80.0)	6(60.0)	5(50.0)
肿瘤直径(cm) tumor diameter(cm)				
≤ 5.0	43	29(67.4) a	17(39.5) a	6(14.0) a
> 5.0	42	38(90.5)	36(85.7)	38(90.5)

AFP				
>400μ g/L	33	26(78.8)	20(60.6)	17(51.5)
≤ 400μ g/L	52	41(78.9)	33(63.5)	27(51.9)
TNM 分期 staging of TNM				
Ⅰ	40	24(60.0) a	13(32.5) a	20(50.0)
Ⅱ	45	43(95.6)	40(88.9)	24(53.3)
病理分级 pathological grade				
Ⅰ	33	19(57.6) a	21(63.6)	17(51.5)
Ⅱ	51	48(94.1)	32(62.7)	27(52.9)
门静脉癌栓 portal vein tumor thrombus				
有 exist	37	22(59.5) a	34(91.9) a	34(91.8) a
无 none	48	45(93.8)	19(39.6)	10(20.8)
肝硬化 liver cirrhosis				
有 exist	46	37(80.4)	30(65.2)	24(52.2)
无 none	38	30(78.9)	23(60.5)	20(52.6)
肿瘤包膜 tumor capsule				
有 exist	34	27(79.4)	14(41.2) a	8(23.5) a
无 none	51	40(78.4)	39(76.5)	36(70.6)

注 a P<0.05

2.3 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达与肝移植术后肝癌复发和转移的相关性

85 例肝移植后全部得到随访 ,截至 2010 年 5 月 31 日 ,随访时间为 5~60 个月 ,中位随访时间 19.4 个月。39 例于随访期

间出现肝癌复发和转移。MMP-2、MMP-9 在未复发和转移组中的表达明显低于复发和转移组(P<0.05) ,而 P53 在两组间的表达差异无显著性(P>0.05) ,见表 2。

表 2 MMP-2、MMP-9 及 P53 的表达与肝移植术后肝癌复发和转移的相关性
Table 2 The correlation between the expression of MMP-2, MMP-9 and P53 and tumor recurrence and metastasis after liver transplantation

	n	MMP-2 表达阳性率 the rate of positive expression of MMP-2	MMP-9 表达阳性率 the rate of positive expression of MMP-9	P53 表达阳性率 the rate of positive expression of P53
复发和转移组				
group of recurrence and metastasis	39	37(94.9)	35(89.7)	21(53.8)
未复发和转移组				
group of none recurrence and metastasis	46	30(65.2)	18(39.1)	23(50.0)

注 :与未复发和转移组比较 a P<0.05 (Compared with group of none recurrence and metastasis, a P<0.05)

2.4 肝癌复发和转移率的多因素 Cox 回归分析

排除年龄、性别、TNM 分期和术前 AFP 水平的影响 ,肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 高阳性表达均是预测肝癌患者肝移植后肿瘤复发和转移的独立预见因子 ,而 P53 未显示其具有预测意义 ,见表 3。

3 讨论

近年来肝移植已成为治疗肝癌的有效手段 ,尽管理论上认为肝移植具有 " 一箭双雕 " 的治疗效果 ,但临床上仍发现不少病例出现肿瘤复发和转移 ,反映了肝癌细胞的高度侵袭性。目前对肝癌术后肿瘤的复发与转移的研究主要集中于手术切除后肿瘤的复发与转移方面 ,而对肝癌行肝移植后肿瘤的复发与转移方面的研究尚显不足^[3]。

最近的研究显示 ,肿瘤细胞和微环境分泌的生物分子在肿

瘤复发和转移过程中扮演了非常重要的角色 ,术前检测受体体内的某些生物分子标记物以及移植后对某些抗体的定量分析均可能帮助预测移植后肿瘤转移和复发的风险^[4-5]。肿瘤的复发及转移首要局部条件为肿瘤细胞必须具备降解细胞外基质的能力 ,基质金属蛋白酶 (MMPs) 是关键的作用因子 ,其中 MMP-2 及 MMP-9 是酶解细胞间基质成分和降解细胞外基质型胶原的主要酶^[6-7]。本研究结果发现肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 阳性表达率均明显高于癌旁组织(P<0.01) ,且 MMP-2 表达与肝癌肿瘤直径、TNM 分期、病理分级及门静脉癌栓显著相关性 (P<0.05) ,MMP-9 表达与肝癌肿瘤直径、TNM 分期、门静脉癌栓及肿瘤包膜显著相关性 (P<0.05)。提示 MMP-2 及 MMP-9 不仅与肝癌的发生有关 ,而且与揭示肿瘤的进展与肿瘤患者的预后的恶性生物学行为密切相关^[8]。

表 3 肝癌复发和转移率的多因素 Cox 回归分析
Table 3 Multivariate Cox regression analysis about the rate of tumor recurrence and metastasis

参数 parameters	OR	95%CI	P
年龄 age	0.82	0.94~1.25	0.128
性别 gender	0.57	0.14~3.45	0.674
TNM 分期 staging of TNM			
II	0.00	0.00	0.958
III	6.72	1.25~21.48	0.025
IV	9.04	1.72~29.19	0.012
术前 AFP 水平 the levels of AFP before surgery	1.03	0.68~2.75	0.394
MMP-2	4.95	1.98~15.28	0.005
MMP-9	4.18	1.64~18.75	0.014
P53	0.85	0.24~1.05	0.094

P53 是体内重要的抑癌基因,对细胞周期调节和细胞凋亡具有重要调控功能。野生型 p53 为抑癌基因,主要参与 DNA 的修复和复制过程,能诱导细胞周期停滞和细胞凋亡。p53 的表达水平和功能的精细是非常重要的。突变型 P53 具有致癌活性,能与野生型 P53 结合成复合物,抑制 P53 基因功能,促进细胞异常增殖,参与肿瘤形成^[9-10]。本研究结果发现肝癌组织中突变型 P53 阳性表达率均明显高于癌旁组织 (P<0.01) P53 表达与肝癌肿瘤直径、门静脉癌栓及肿瘤包膜显著相关性(P<0.05),说明 p53 突变可能是肝癌的早期发生事件之一,其高表达与与癌细胞恶性增殖、侵袭的生物学特性相符合。

本研究结果中,85 例肝癌肝移植患者移植后发生复发和转移者有 39 例,未复发和转移组中 MMP-2、MMP-9 的表达明显低于复发和转移组 (P<0.05),提示肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 强阳性表达的患者可能有较高的侵袭和转移能力,预后较差。同时排除年龄、性别、TNM 分期和术前 AFP 水平的影响,肝癌组织中 MMP-2、MMP-9 强阳性表达是预测肝癌患者肝移植后肿瘤复发和转移的独立预见因子,提示 MMP-2、MMP-9 不仅有助于判断肿瘤的恶性程度,而且对预测移植后肿瘤复发和转移也有较强的实用价值。

本研究发现 P53 在复发和转移组和未复发和转移组之间的表达差异无显著性(P>0.05),多因素分析也没有显示 P53 阳性表达与肝癌患者肝移植术后复发和转移有关。提示 P53 基因突变可能仅与肿瘤发生密切相关,而对肿瘤的浸润和转移无明显作用。这与以往一些研究结果是相似的^[11-12],有关 P53 在肝癌肝移植复发转移中的地位及作用仍有待深入研究。

参 考 文 献 (References)

[1] 朱继巧,秦建民,陈大志.肝癌肝移植术后复发机制及其研究进展[J]. 国际移植与血液净化杂志,2007, 5(3):17-19
Zhu Jiqiao, Qin Jianmin, Chen Dazhi. Research on the pathogenesis of tumor recurrence and metastasis after liver transplantation[J]. Journal of international transplantation and blood purification, 2007, 5(3): 17-19

[2] Huntley H. Image-guided treatment for liver cancer [J]. Radiol Technol, 2010, 82(2):161VI-178VI

[3] Sharma P, Saini SD, Kuhn LB, et al. Knowledge of Hepatocellular Carcinoma Screening Guidelines and Clinical Practices Among Gas-

troenterologists[J]. Dig Dis Sci, 2010 [Epub ahead of print]

[4] Ishibashi Y, Matsumoto T, Niwa M, et al. CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma [J]. Cancer, 2004,101 (9): 1994-2000

[5] Fiorentino M, Altimari A, Ravaioli M, et al. Predictive value of biological markers for hepatocellular carcinoma patients treated with orthotopic liver transplantation [J]. Clin Cancer Res, 2004,10 (5): 1789-1795

[6] Luo Y, Liang F, Zhang ZY.PRL1 promotes cell migration and invasion by increasing MMP2 and MMP9 expression through Src and ERK1/2 pathways[J]. Biochemistry, 2009, 48(8):1838-1846

[7] Padrissa-Alté s S, Zaouali MA, Franco-Gou R, et al. Matrix metalloproteinase 2 in reduced-size liver transplantation: beyond the matrix [J]. Am J Transplant, 2010, 10(5):1167-1177

[8] Reimers N, Zafrakas K, Assmann V, et al. Expression of extracellular matrix metalloproteases inducer on micrometastatic and primary mammary carcinoma cells [J]. Clin Cancer Res, 2004,10 (10): 3422-3428

[9] 方炼,黄必军,梁启万. 原发性肝癌 p53 基因高频缺失的双色荧光原位杂交证据[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(3) :306-309
Fang Lian, Huang Bijun, Liang Qinwan. The evidence about the high-frequency missing of P53 gene in hepatocellular carcinoma in two-color fluorescence situ hybridization [J]. Journal of Chinese pathophysiology, 2003, 19(3) :306-309

[10] Yuan RH, Jeng YM, Hu RH, et al. Role of p53 and β -catenin Mutations in Conjunction with CK19 Expression on Early Tumor Recurrence and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma [J]. J Gastrointest Surg, 2010 [Epub ahead of print]

[11] Kawahm M, Kammofi M, Kanauchi H, et al. Immunohistochemical prognostic indicators of gastrointestinal careinoid tumours [J]. Eur J Srug Oneol, 2002, 28(2) :140-146

[12] 孔令员,张景玲,班润武,等.PCNA、p53、MMP-2 的表达与胃癌预后的关系[J].中国实用医学研究杂志, 2004, 3(2):112-113
Kong Lingyuan, Zhang Jingling, Ban Runwu, et al. The association between the expression of PCNA, P53 and MMP-2 and the prognosis of gastric cancer [J]. Journal of Practical Medicine, 2004, 3 (2): 112-113