

· 临床研究 ·

# KISS-1 和 MMP-9 在 51 例鼻咽鳞状细胞癌中的表达和临床意义

唐立滨<sup>1</sup>, 宋旭东<sup>2</sup>

(1. 河北省唐山市人民医院耳鼻咽喉科 063001; 2. 华北煤炭医学院病理科, 河北唐山 063000)

**摘要:**目的 探究肿瘤抑制性因子 KISS-1 及基质金属蛋白酶 9(MMP-9)在鼻咽癌发生、发展中的作用及二者之间的关系。方法 选择 1999 年 1 月至 2006 年 3 月在唐山市人民医院初次诊断并手术切除的鼻咽癌 51 例为鼻咽癌组,鼻咽部慢性炎症组织标本 30 例为对照组。分别进行 HE 染色及链霉素抗生物素蛋白-过氧化酶(SP)法进行免疫组织化学染色,检测 KISS-1、MMP-9 在鼻咽癌和慢性炎症组织中的阳性表达率,并做相关的统计学分析。结果 炎性鼻咽组织中 KISS-1 蛋白的阳性表达率(96.7%)高于鼻咽癌组织中 KISS-1 蛋白的阳性的表达率(47.1%);慢性鼻咽黏膜炎症组织中 MMP-9 蛋白呈阴性或低阳性表达(40.0%),而鼻咽鳞状细胞癌中 MMP-9 蛋白多为高阳性表达(86.3%)。在鼻咽癌组中,KISS-1 显现低表达状态,而 MMP-9 呈高表达状态。统计分析二者成反向表达。结论 KISS-1 蛋白表达降低、MMP-9 表达升高将有助于鼻咽癌的转移和扩散,同时检测二者的表达状况可指导临床及时有效地采取相应的检查和治疗,为评判临床预后提供切实可行的观测指标。

**关键词:**基质金属蛋白酶 9;鼻咽肿瘤;免疫组织化学;KISS-1

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.26.008

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)26-2620-02

## Study on expression and clinical significance of KISS-1 and MMP-9 with 51 cases of nasopharyngeal squamous cell carcinoma

Tang Libin<sup>1</sup>, Song Xudong<sup>2</sup>

(1. Department of Otolaryngology, Tangshan People's Hospital, Tangshan 063001, Hebei, China;

2. Department of Pathology, North China Coal Medical School, Tangshan 063000, Hebei, China)

**Abstract:** **Objective** To study the significance of tumor inhibitive gene KISS-1 and matrix metalloproteinase-9 in the nasopharyngeal carcinoma cancer and their relationship. **Methods** 51 cases of nasopharyngeal carcinoma and 30 cases of chronic rhinitis were collected. Expression of KISS-1 protein and MMP-9 protein were examined by SP immunohistochemistry assays. The positive expression rates of KISS-1 and MMP-9 in the nasopharyngeal carcinoma tissue and in the chronic rhinitis tissue were detected and were analyzed. **Results** The positive expression rate of KISS-1 protein in the chronic rhinitis tissue(96.7%) was obviously higher than that in the nasopharyngeal carcinoma tissue(47.1%). The positive expression rate of MMP-9 protein in the nasopharyngeal carcinoma tissue(86.3%) was obviously higher than that of the chronic rhinitis tissue(40.0%). The positive expression rate of MMP-9 protein was obviously high in the nasopharyngeal carcinoma tissue, reversely of KISS-1 protein. It had negative relationship between the expression of KISS-1 protein and MMP-9 protein. **Conclusion** The abnormal expression of KISS-1 protein and MMP-9 protein were correlated with invasion and metastasis of the nasopharyngeal carcinoma and may be important prognostic index for judging the clinical prognosis. At the same time, the detection of expression of those protein may be used for guiding clinical examine and treatment efficiently and promptly.

**Key words:** matrix metalloproteinase9; nasopharyngeal neoplasms; immunohistochemistry; KISS-1

运用免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase, SP)法检测 KISS-1 和基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在鼻咽癌组织中的表达状况及二者间的相互作用,探讨 KISS-1 和 MMP-9 对鼻咽癌生物学行为的影响,揭示鼻咽癌早期转移的形成机制,为临床诊治及预后判断提供理论依据,现将鼻咽癌标本 51 例及鼻咽慢性炎症组织 30 例的分析结果报道如下。

### 1 材料与方法

**1.1 标本来源** 选择 1999 年 1 月至 2006 年 3 月在唐山市人民医院初次诊断并手术切除的鼻咽癌石蜡标本 51 例。所有标本术前均未经任何放疗、化疗和其他抗肿瘤治疗。所有鼻咽癌标本参照 1992 年福州鼻咽癌 TNM 分期标准进行分期。其中男 38 例,女 13 例;年龄 23~76 岁,平均 46 岁,其中,≤40 岁 10 例,>40~60 岁 26 例,>60 岁 15 例;病理诊断鼻咽低分化鳞状细胞癌 48 例,鼻咽高分化鳞状细胞癌 3 例;颈淋巴结阳性转移组 32 例,颈淋巴结阴性转移组 19 例;临床分期中 I~II 期 12 例,III~IV 期 39 例。另外取鼻咽部病理活检证实为鼻咽慢性炎症组织标本 30 例作对照组。

**1.2 试剂及仪器** 鼠抗人单克隆 KISS-1 抗体原液(美国凤凰药业有限公司),鼠抗人单克隆 MMP-9 抗体(福州迈新生物技术开发公司),CMIAS 真彩色医学图像分析系统(北京航空航天大学)。采用即用型 SP 免疫组化试剂盒(福州迈新生物技术开发公司)。

**1.3 试验方法** 病理置 10% 中性缓冲甲醛溶液中固定。经标准乙醇梯度脱水,二甲苯透明 2 次,浸蜡包埋。每个石蜡包埋的病理组织以切片机制备成 4 μm 厚的切片,连续切片 3 张,再脱蜡至水。其中 1 张行 HE 染色,另外 2 张分别做 KISS-1、MMP-9 免疫组织化学染色。

**1.4 判定标准** 运用双盲法进行交叉阅片并记录。免疫组织化学染色显示 KISS-1、MMP-9 标志物主要在细胞质内表达,部分在细胞核内表达,呈棕黄色细颗粒。染色结果以着色强度高于背景者判定为阳性。利用 CMIAS 真彩色医学图像分析系统,为减少人为的影响,以免疫组织化学记分作为阳性的评判标准。记分值的算式为:H=N×IN 代表随机观察的 10 个高倍镜视野中的平均阳性细胞数,然后按阳性细胞的百分比统计记分。阳性细胞数记分(N):0 分:<10%,1 分:≥

10%~30%, 2 分: ≥30%~60%, 3 分: ≥60%~75%, 4 分: ≥75%。I 代表着色强度记分。1 分: 弱(+, 淡黄色), 2 分: 中等(++ , 棕黄色), 3 分: 强(+++ , 深棕黄色)。显色强度与背景无明显差别者为阴性。若 H>1 为阳性, 若 H≤1 则为阴性。0~1 分为阴性(-), 2~3 分为弱阳性(+), 4~6 分为中等阳性(++), 6 分以上为强阳性(+++ )。

**1.5 统计学处理** 应用 SPSS11.5 统计软件进行数据分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。组间比较采用  $\chi^2$  检验,  $P < 0.05$  为差别有统计学意义。

**2 结 果**

KISS-1、MMP-9 在鼻咽癌及鼻咽部炎症组织中的表达结果见表 1, 插图 1、2。在各临床病理中的变化见表 2。

**表 1 KISS-1、MMP-9 在鼻咽癌及鼻咽部炎症组织中的表达**

组别	n	KISS-1 阳性表达[n(%)]	MMP-9 阳性表达[n(%)]
鼻咽癌组	51	24(47.1)*	44(86.3)△
对照组	30	29(96.7)	12(40.0)

\*:  $P < 0.05$ ; △:  $P < 0.01$ , 与对照组比较。

**表 2 KISS-1 与 MMP-9 在各临床病理分组间的阳性表达率**

指标	n	KISS-1 阳性(n)	MMP-9 阳性(n)
性别			
男	38	17(44.7)	33(86.8)
女	13	7(53.8)	11(84.6)
年龄			
23~40	10	4(40.0)	8(80.0)
41~60	26	12(46.2)	23(88.5)
61~76	15	8(53.3)	13(86.7)
原发灶分期			
T1~T2	18	8(44.4)	15(83.3)
T3~T4	33	16(48.5)	29(87.9)
临床分期			
I~II 期	12	9(75.0)	8(66.7)
III~IV 期	39	15(38.5)*	36(92.3)*
分化程度			
高分化	3	2(66.7)	2(66.7)
低分化	48	22(45.8)	42(87.5)
淋巴结转移			
有	32	11(34.4)	31(96.9)
无	19	13(68.4)△	13(68.4)△

\*:  $P < 0.05$ , 与 I~II 期比较; △:  $P < 0.05$ , 与有淋巴结转移比较。

**3 讨 论**

1996 年, Lee 和 Welch<sup>[1]</sup> 运用微细胞介导的染色体转移法 (micro cell mediated chromosome transfer, MMCT) 发现了 KISS-1 基因。通过 Northern Blot 试验证实, 在正常的心、脑、肝、肺和骨骼肌组织中可检测到该基因的表达<sup>[2]</sup>, 在肾脏和胰腺中微弱表达, 而胎盘组织中高表达。Ohtaki 等<sup>[3]</sup> 研究发现, KISS-1 编码的蛋白质羧基末端 (61~121) 的 54 个氨基酸还是

人孤儿 G 蛋白偶联受体 (命名为 hOT7T175、GPR54 或 AXOR12) 的天然配体, 而被命名为转移抑素 (metastin)。

MMP-9 (明胶酶 B) 是 MMPs 家族中的重要成员, 相对分子质量为  $Mr 92 \times 10^3$ , 它可由结缔组织细胞、巨噬细胞或肿瘤细胞分泌, 是降解 IV 型胶原最主要的酶, 在生理情况下维持细胞外基质、在胚胎发育、组织塑形中起着不可替代的作用<sup>[4]</sup>。王军等<sup>[5]</sup> 等研究发现, MMP-9 在鼻咽癌组织表达率明显高于正常组织。而且, MMP-9 在鼻咽癌组织中的高表达与临床病理分期有关, 伴淋巴结转移者的阳性表达率与无淋巴结转移者的阳性表达率差异也具有显著性。有研究显示, MMP-9 蛋白的表达与临床病理分期和淋巴结转移有关<sup>[6-7]</sup>。相同的结论在胸部肿瘤、肠道肿瘤及骨肉瘤中得到证实<sup>[8-9]</sup>。张欣欣等<sup>[10]</sup> 认为鼻咽癌组织中 MMP-9 蛋白高表达与淋巴结转移有关, 可能与鼻咽癌起源于上皮组织, 主要经淋巴道转移而非血道转移的机制相吻合。

牛慧彦等<sup>[11]</sup> 研究发现, 不同生长时期的异位内膜组织其 KISS-1 基因和 MMP-9 基因的表达不同。在异位病灶形成过程中, KISS-1 基因的表达受到抑制, 使异位内膜具有更强的侵袭能力, 更容易种植生长, 这与转移性肿瘤中 KISS-1 基因表达缺失或降低的结果一致<sup>[12-13]</sup>。同时 KISS-1 弱表达削弱了对 MMP-9 基因表达的抑制作用, 使 MMP-9 表达升高, 异位内膜组织水解能力增强, 异位内膜周围的基底膜被降解, 进一步促进异位内膜种植生长, 并不断增大。

2001 年, Yan 等<sup>[14]</sup> 发现, 在 6 个 MMP-9 mRNA 阳性细胞系中无 KISS-1 mRNA 表达。有研究发现, 与单纯转染空载体粒 pcDNA3 的对照组相比, 转染 KISS-1 基因的 HT1080 细胞中 MMP-9 mRNA 的合成速率明显降低。由佛波酯 (PMA) 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) 各自激活 FRKs 基因和 JNFs 基因会上调 MMP-9 表达, 而不受 KISS-1 影响, 说明 KISS-1 作用于靶点并非通过蛋白激酶 (MAPK) 途径。其研究证明, KISS-1 并未影响 AP-1、Sp1 和 FTs 等转录因子与 MMP-9 启动子结合, 而是抑制 NF- $\kappa$ B 与 MMP-9 启动子结合使后者表达降低。静息状态下 NF- $\kappa$ B 与抑制蛋白 I $\kappa$ B $\alpha$ 、I $\kappa$ B $\beta$  结合, 以无活性状态存在细胞质内, 胞外多种刺激可活化 I $\kappa$ B 激酶, 使 I $\kappa$ B 磷酸化后降解, NF- $\kappa$ B 随即活化进入核内和相应 DNA 序列结合, 发挥对基因转录、表达控制的作用。KISS-1 就是通过使 HF1080 细胞中 I $\kappa$ B 含量增加而封锁了 NF- $\kappa$ B 向核内迁移, 使 NF- $\kappa$ B 与 MMP-9 启动子结合减少导致 MMPmRNA 稳定水平下降, 合成速率显著降低。

本研究发现, 在鼻咽癌组织中, KISS-1 存在表达, 且与 MMP-9 表达状态统计分析二者差异有显著性, 成反向表达。这和前人做的相关实验相吻合<sup>[11]</sup>。因此, 同时检测肿瘤组织中 KISS-1 与 MMP-9 的表达, 如出现 MMP-9 呈高表达、KISS-1 低表达, 提示远处转移的可能性大, 建议临床医师尽早做出相应的检查, 充分评估患者的临床分期, 并制定相应的治疗方案。

总之, 通过本实验揭示了 KISS-1 和 MMP-9 对鼻咽癌生物活性的影响, 进一步证实 KISS-1 蛋白表达降低、MMP-9 表达升高将有助于鼻咽癌的转移和扩散, 同时检测二者的表达状况可指导临床及时有效地采取相应的检查和治疗, 为评判临床预后提供切实可行的观测指标。

**参考文献:**

[1] Lee JH, Welch DR. Identification of highly expressed genes in metastasis suppressed chromosome (下转第 2624 页)

中,异位妊娠组、正常宫内妊娠组及异常宫内妊娠组测定的子宫内膜厚度分别为(7.5±3.8)mm、(12.8±4.3)mm、(10.1±3.6)mm,3组两两比较差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),异位妊娠组明显低于其他两组,临界点为 8.35 mm,与 Spandorfer 和 Bamhart<sup>[8]</sup>结果比较接近。

虽然有研究评价过血清 $\beta$ -hCG、黄体酮、子宫内膜厚度对早期异位妊娠的诊断价值<sup>[9-10]</sup>,但由于研究方法较单一,数据没有充分挖掘信息。本研究主要应用 ROC 曲线法对血清 $\beta$ -hCG、黄体酮、子宫内膜厚度三项联合进行分析评价。ROC 曲线分析通过诊断界点的移动,获得多对灵敏度和误诊率,以灵敏度为纵轴,以误诊率为横轴,连接各点绘制曲线,然后计算曲线下的面积,面积越大,诊断价值越高。一般认为,面积在 0.5 以下时无诊断价值;面积在 0.5~0.7 时有较低的准确性;面积在 0.7~0.9 时有较高的准确性;面积在 0.9 以上时准确性最高<sup>[11]</sup>。

总之,本研究认为血清 $\beta$ -hCG、黄体酮、子宫内膜厚度三项联合检测可显著提高异位妊娠诊断的灵敏度,优于血清 $\beta$ -hCG、黄体酮和子宫内膜厚度的单项检测,值得临床借鉴。

#### 参考文献:

- [1] 陈平雁. SPSS13.0 统计软件应用教程[M]. 北京:人民卫生出版社,2006:322-326.
- [2] 刘润幸. 使用 SPSS 作多变量观察值的 ROC 曲线分析[J]. 中国公共卫生,2003,19(6):1152.
- [3] 乐杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2008:105.

- [4] 曹泽毅. 中华妇产科学[M]. 临床版. 北京:人民卫生出版社,2010:315-317.
- [5] Grynberg M, Teyssedre J, Andre C, et al. Rupture of Ectopic Pregnancy With Negative Serum  $\beta$ -hCG Leading to Hemorrhagic Shock[J]. Obstet Gynecol, 2009, 113(32): 537-539.
- [6] 许燕丽,武孟香,刘丽萍. 血清 LIF、TNF- $\alpha$ 、E2、P、 $\beta$ -HCG 在异位妊娠早期诊断中的作用[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2008,24(4):198-300.
- [7] 宋茜,柳友清,黄诚刚,等. 子宫内膜厚度、 $\beta$ -HCG 联合黄体酮检测对异位妊娠与早早孕诊断价值的探讨[J]. 实用妇产科杂志,2006,22(1):48-50.
- [8] Spandorfer SD, Bamhart KT. Endometrial stripe thickness as a predictor of ectopic pregnancy[J]. Fertil Steril, 1996, 66(9):474-477.
- [9] 吴玉英.  $\beta$ -HCG、黄体酮及子宫内膜厚度联合用于早期异位妊娠 58 例的诊断价值[J]. 广西医学,2009,31(1):41-43.
- [10] 夏维珍,刘红.  $\beta$ -HCG、黄体酮及子宫内膜厚度诊断早期异位妊娠的价值[J]. 右江民族医学院学报,2008,30(2):196-198.
- [11] 王乐三. SPSS 在医学科研中的应用[M]. 北京:化学工业出版社,2007:250.

(收稿日期:2011-04-23 修回日期:2011-05-25)

(上接第 2621 页)

- 6/human malignant melanoma hybrid cells using subtractive hybridization and differential display[J]. Int J Cancer, 1997, 71(6):1035-1044.
- [2] Clarkson J, Herbison AE. Postnatal development of Kisspeptin neurons in mouse hypothalamus, sexual dimorphism and projections to gonadotropin-releasing hormone neurons[J]. Endocrinology, 2006, 147(12):5817-5825.
- [3] Ohtaki T, Shintani Y, Honda S, et al. Metastasis suppressor gene KISS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor[J]. Nature, 2001, 411(6837):613-617.
- [4] Hulkkonen J, Pertovaara M, Anttonen J, et al. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) gene polymorphism and MMP-9 plasma levels in primary Sjogren's syndrome[J]. Rheumatology(Oxford), 2004, 43(12):1476-1479.
- [5] 王军,崔德威,姚俊,等. MMP-9 及 TIMP-1 在鼻咽癌组织中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2003, 9(6):337-339.
- [6] Davidson B, Goldberg I, Kopolovic J, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in squamous cell carcinoma of the uterine cervix[J]. Gynecol Oncol, 1999, 72(3):380-386.
- [7] 周彩云,姚济芬,陈晓端,等. 基质金属蛋白酶 MMP-2, 9 及其抑制因子 TIMP-1, 2 在宫颈鳞癌中表达的研究[J]. 癌症, 2002, 21(7):735-739.
- [8] 彭挺生,岳钜世,吴惠茜,等. 基质金属蛋白酶-2, 9 及其抑制剂在骨肉瘤中表达的意义[J]. 中山大学学报:医学科学版, 2003, 24(2):132-135.

- [9] 苗丽君,王静,李珊珊,等. 磷酸化 AKT 及 Cyclin d1、MMP-9 在非小细胞肺癌中的表达及相关研究[J]. 中国现代医学杂志, 2007, 17(7):786-790.
- [10] 张欣欣,郭永清,叶青,等. 基质金属蛋白酶 MMP-9 和 MMP-2 与鼻咽癌转移的相关性研究[J]. 临床耳鼻喉科杂志, 1999, 13(8):356-358.
- [11] 牛慧彦,王丹波,张淑兰,等. KISS-1 和 MMP-9 在裸鼠子宫内膜异位症模型中的表达及意义[J]. 中国医科大学学报, 2004, 33(6):487-489.
- [12] Sanchez-Carbayo M, Capodiceci P, Cordon-Cardo C. Tumor suppressor role of KISS-1 in bladder cancer loss of KISS-1 expression is associated with bladder cancer progression and clinical outcome[J]. Am J Pathol, 2003, 162(2):609-617.
- [13] Ringel MD, Hardy E, Bernet VJ, et al. Metastin receptor is overexpressed in papillary thyroid cancer and activates MAP kinase in thyroid cancer cells[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2002, 87(5):2399-2402.
- [14] Yan C, Wang H, Boyd DD. KISS-1 represses 922 kDa type IV collagenase expression by down regulating NF kappa B binding to the promoter asac on sequence of I kappa B alpha induced block of p65/p50 nuclear translocation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(2):1164-1172.

(收稿日期:2011-01-09 修回日期:2011-03-22)