

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.10.024

MMP-14 蛋白在胃癌侵袭转移中的表达和作用

谷倬宇¹, 李思源², 肖智伟¹, 周婷¹, 李军^{1Δ}

(1. 石河子大学医学院第一附属医院; 2. 新疆地方与民族高发疾病教育部重点实验室, 新疆石河子 832002)

[摘要] **目的** 探讨人胃癌组织中基质金属蛋白酶 14(MMP-14) 的表达及其与胃癌侵袭、转移的关系。**方法** 采用免疫组化法检测 59 份胃癌组织(观察组)和 20 份正常胃组织(对照组), 为经病理证实距肿块边缘 5 cm 的正常组织中 MMP-14 的表达情况, 并分析 MMP-14 与胃癌临床病理参数的关系, 以及 MMP-14 在胃癌不同 TNM 分期中的表达特点。**结果** 观察组胃癌组织中 MMP-14 的表达阳性率为 50.85% (30/59), 对照组胃组织 MMP-14 表达阳性率为 5.00% (1/20), 观察组 MMP-14 表达阳性率明显高于对照组($P < 0.01$); MMP-14 的表达水平与胃癌分化程度、区域淋巴结转移程度、浸润深度、淋巴管浸润与否及 TNM 分期有关, 均差异有统计学意义($P < 0.01$); 随着 TNM 分期的进展 MMP-14 蛋白表达上调, 且有从胞质向细胞膜转运的趋势。**结论** 胃癌组织中存在 MMP-14 的高表达, 有助于胃癌细胞的侵袭和转移。

[关键词] 胃肿瘤; 基质金属蛋白酶 14; 肿瘤浸润; 肿瘤转移; 免疫组织化学

[中图分类号] R735.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2015)10-1365-03

Expression and role of MMP-14 protein in invasion and metastasis of stomach carcinoma

Gu Zhuoyu¹, Li Siyuan², Xiao Zhiwei¹, Zhou Ting¹, Li Jun^{1Δ}

(1. First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832002, China;

2. Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic Disease of Ministry of Education, Shihezi, Xinjiang 832002, China)

[Abstract] **Objective** To explore the expression of matrix metalloproteinase-14(MMP-14) protein in the human stomach carcinoma tissues and its correlation with carcinoma invasiveness and metastasis. **Methods** The MMP-14 protein expression was detected by immunohistochemistry in 59 cases of stomach carcinoma tissues (observation group) and 20 cases of normal stomach tissues (control group, the adjacent normal tissues from the tumor margin of 5 cm confirmed by pathology), and its correlation with the clinically pathological parameters was analyzed. The expression characteristics of MMP-14 among various TNM stages of stomach carcinoma were also analyzed. **Results** The positive rate of MMP-14 expression was 50.85% (30/59) in the observation group and 5.00% (1/20) in the control group, the positive rate of the observation group was significantly higher than that of the control group ($P < 0.01$); the expression level of MMP-14 was correlated with the differentiation degree, regional lymph node metastasis degree, invasion depth, lymphatic invasion and TNM stage, which showing the statistical difference ($P < 0.01$); the expression of MMP-14 protein was up-regulated and showed the transferring trend from cytoplasm to cellular membrane along with the progression of TNM stage. **Conclusion** The overexpression of MMP-14 protein exists in stomach carcinoma tissues, which contributing to the invasion and metastasis of stomach carcinoma cells.

[Key words] stomach neoplasms; matrix metalloproteinase 14; neoplasm invasiveness; neoplasm metastasis; immunohistochemistry

胃癌是中国乃至世界上最常见的致死性恶性肿瘤之一, 其恶性程度分别排在中国男性和女性的第 3 位和第 4 位^[1-2]。胃癌患者的病死率极高, 死因多是由于原发灶的术后转移复发和周围血管浸润, 其发病机制十分复杂, 研究证实溶解周围基质是该过程的关键生物学事件, 而基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)可降解细胞基底膜(BD)和细胞外基质(ECM), 是该过程中最重要的蛋白水解酶类, 是肿瘤细胞向周围浸润的重要桥梁^[3]。MMPs 中跨膜的 MMP-14 蛋白, 是恶性肿瘤入侵的关键蛋白^[4-5]。本试验通过测定胃癌组织和正常胃组织中 MMP-14 的蛋白表达情况, 分析 MMP-14 与胃癌临床病理特征的关系, 并探讨其不同胃癌组织 TNM 分期中的表达特点, 旨在探讨胃癌侵袭转移的相关机制。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取石河子大学医学院第一附属医院病理科 2012 年 1 月至 2013 年 5 月经 10% 甲醛固定和石蜡包埋的胃癌组织切片 59 份(观察组), 经病理专家验证距肿瘤边缘 5 cm 的正常胃组织 20 份(对照组)。观察组中男 44 例, 女 15 例; 年

龄 50~81 岁, 平均(60.41±7.21)岁。纳入标准: 符合 WHO 胃癌诊断标准; 术前未行分子靶向治疗、生物基因治疗及放疗; 由至少两位病理专家共同阅片确诊; 临床资料完整。

1.2 方法

1.2.1 抗体和试剂 MMP-14 兔抗人多克隆抗体购自英国 Abcam 公司, 免疫组化染色试剂盒 SP9000 及浓缩型 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物有限公司。

1.2.2 免疫组化染色 4 μm 的石蜡切片脱蜡水化后用新鲜配制的 3% 过氧化氢液体进行室温封闭, PBS 清洗干净后滴加正常山羊血清封闭液室温封闭 30 min, 4 ℃ 滴加 1:100 稀释比例的一抗过夜, 37 ℃ 复温 1 h 后滴加生物素化二抗孵育半小时, 依染色试剂盒说明书室温滴加辣根过氧化物酶标记工作液, 镜下 DAB 显色, 苏木素复染脱水后用中性透明树脂胶封片。以 PBS 液代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 结果判定 染色结果判定采用半定量分析法, 在高倍镜下随机挑选 5 个视野, 根据细胞染色强度计分: 不着色为 0 分, 浅黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分。根据阳性细

胞百分率计分: <5% 为 0 分, 5%~<25% 为 1 分, 25%~<50% 为 2 分, 50%~<75% 为 3 分, ≥75% 为 4 分。两项评分相乘: 0~1 分为阴性, >1 分为阳性。

1.2.4 免疫组化图像分析 随机选取 TNM 分期中 10 个不同的视野, 采用 Image Pro Plus 6.0 图像检测系统分析细胞染色结果, 用平均光密度(OD)值表示 MMP-14 染色强度。

1.3 统计学处理 所有数据采用 SPSS18.0 统计软件进行分析, 采用 χ^2 检验分析 MMP-14 与临床病理特征的关系, 采用方差分析和 LSD 检验分析不同 TNM 分期的 OD 值。检验水准 $\alpha=0.05$, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-14 在胃癌组织和正常胃组织中的表达 MMP-14 在正常胃组织中阴性表达(图 1A), 仅有极少数微弱表达。MMP-14 在胃癌组织中的表达主要位于细胞质, 大多数呈中等或强阳性表达(图 1B)。观察组 MMP-14 阳性表达率为 50.85%(30/59), 显著高于对照组 5.00%(1/20), 两组比较差异有统计学意义($\chi^2=11.32, P<0.01$)。

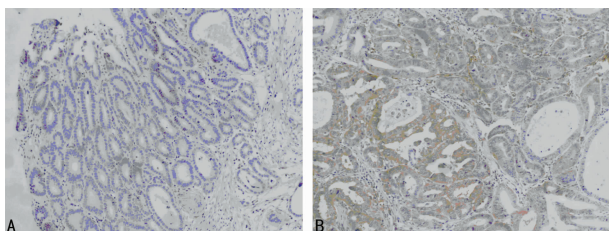


图 1 对照组(A)及胃癌组(B)MMP-14 的免疫组化染色结果(×100)

2.2 MMP-14 表达与胃癌临床病理特征的关系 胃癌浸润程度越深、分化程度越低、淋巴结转移程度越重、TNM 分期进展程度越晚, MMP-14 表达的阳性率越高($P<0.01$), 见表 1。

2.3 MMP-14 表达在胃癌不同 TNM 分期中的表达特点 MMP-14 在胃癌细胞中的表达多位于细胞质, 随着 TNM 分期进展, 开始出现细胞膜表达(图 2, 箭头为细胞膜阳性)。II、III、IV 期的平均 OD 值分别为 222.64±6.73、250.22±11.41、295.63±6.88, 不同 TNM 分期的 MMP-14 表达强度差异有统计学意义($P<0.01$), 见图 3。

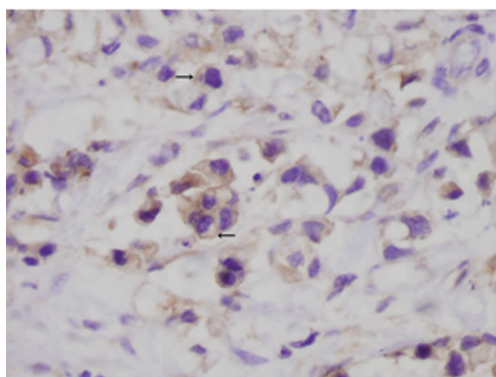


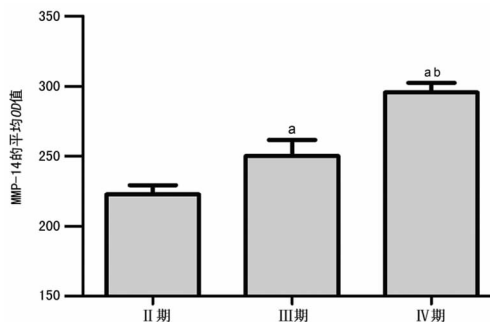
图 2 MMP-14 在细胞膜阳性表达(×400)

表 1 MMP-14 表达与胃癌临床病理特征的关系[n(%)]

临床病理特征	n	MMP-14 阳性	χ^2	P
分化程度				
高、中	22(37.29)	4(18.18)	12.97	0.00
低	37(62.71)	26(70.27)		
浸润深度				
T ₁₋₂	20(33.90)	5(25.00)	8.09	0.00
T ₃₋₄	39(66.10)	25(64.10)		

续表 1 MMP-14 表达与胃癌临床病理特征的关系[n(%)]

临床病理特征	n	MMP-14 阳性	χ^2	P
区域淋巴结转移				
N ₀	24(40.68)	7(29.17)	7.61	0.00
N ₁₋₃	35(59.32)	23(65.71)		
TNM 分期				
I/II	30(50.85)	10(33.33)	7.49	0.00
III/IV	29(49.15)	20(68.96)		



a, $P<0.01$, 与 II 期比较; b, $P<0.01$, 与 III 期比较。

图 3 MMP-14 在不同 TNM 分期中的平均 OD 值比较

3 讨论

MMPs 通过对 ECM 中各种成分的降解, 在肿瘤侵袭转移中的作用十分关键, 是一组重要的 ECM 降解酶类。大量研究表明, MMPs 的高表达和多种肿瘤的发生、发展密切相关^[6-8]。MMP-14 是 MMPs 家族的重要成员, 又被称为膜型 MMP-1 (MT1-MMP), 是第 1 个发现的具有跨膜序列的 MMPs, MMPs 的表达增加可以触发级联激活过程, 致使细胞周围的纤维蛋白溶解, 这是肿瘤细胞侵袭的重要特征^[9]。

国内研究发现, MMP-14 在胃癌组织中阳性表达率很高, 并且 MMP-14 阳性表达组与阴性对照组相比更易发生区域淋巴结转移^[10]。国外研究显示, 胃癌组织和癌旁正常组织中 MMP-14 蛋白表达的比值与淋巴转移和肿瘤分期有关^[11], 胃癌细胞中 MMP-14 表达下调后发生转移的能力下降, 增殖能力强、侵袭迁移能力高的肿瘤细胞 MMP-14 的表达明显上调^[12-13]。本研究胃癌组织中 MMP-14 蛋白表达阳性率为 50.85%, 与文献报道接近^[10]。本研究结果也证明了胃癌组织中 MMP-14 的阳性表达与胃癌的区域淋巴结转移程度、浸润深度、TNM 分期等密切相关, 提示 MMP-14 在肿瘤的浸润、转移中起着举足轻重的作用。近年来的研究发现上调非经典 Wnt 通路中 Wnt5a 的表达, 可使聚集增多的 β -catenin 与核内转录因子发生作用, 进而激活靶基因诱导 MMP-14 表达^[14-15]。此外 NF- κ B 通路介导的环氧酶-2 的表达也可能是 MMP-14 的一个重要调控点^[16], 而 MMP-14 表达相关的分子机制仍有待于进一步的研究。

在侵袭转移过程中, 随着肿瘤细胞与 ECM 相互作用并对其重塑, MMP-14 开始在细胞膜伪足处聚集, 这种伪足是特殊的细胞膜突起, 富含支架蛋白、肌动蛋白、胞吐复合体及各种酶类, 是肿瘤入侵的首要区域^[17]。本研究结果表明, 随着 TNM 分期进展, MMP-14 蛋白表达上调并开始出现细胞膜阳性, 这不仅提示胃癌细胞的侵袭能力与 MMP-14 表达水平呈正相关, 而且提示细胞内存在某种运动调控机制使 MMP-14 逐渐向细胞膜定向转运, 进而有助于胃癌细胞侵袭和转移, 但具体的胞内转运机制尚不明确。

综上所述, 胃癌组织中的 MMP-14 表达水平明显增高, 且胃癌侵袭转移的关键事件可能是通过影响 MMP-14 的表达和

转运而增加胃癌的侵袭力,目前的研究结果提示,可以通过抑制 MMP-14 的作用进而影响肿瘤的侵袭和转移能力。因此,对 MMP-14 的深入研究将有助于对肿瘤治疗提供新的治疗前景,为临床进一步治疗晚期恶性肿瘤提供新的思路。

参考文献

- [1] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics[J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [2] Wu Y, Fan Y, Jiang Y, et al. Analysis of risk factors associated with precancerous lesion of gastric cancer in patients from eastern China: a comparative study[J]. *J Cancer Res Ther*, 2013, 9(2):205-209.
- [3] Gencer S, Cebeci A, Irmak-Yazicioglu MB. Matrix metalloproteinase gene expressions might be oxidative stress targets in gastric cancer cell lines[J]. *Chin J Cancer Res*, 2013, 25(3):322-333.
- [4] Pahwa S, Stawikowski MJ, Fields GB. Monitoring and inhibiting MT1-MMP during cancer initiation and progression[J]. *Cancers*, 2014, 6(1):416-435.
- [5] Shi F, Sottile J. MT1-MMP regulates the turnover and endocytosis of extracellular matrix fibronectin [J]. *J Cell Sci*, 2011, 124(Pt 23):4039-4050.
- [6] Gong Y, Chippada-Venkata UD, Oh WK. Roles of matrix metalloproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression[J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(3):1298-1327.
- [7] Orgaz JL, Pandya P, Dalmeida R, et al. Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration[J]. *Nat Commun*, 2014, 5(10):4255-4261.
- [8] Roomi MW, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, et al. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(2):887-894.
- [9] Williams KC, McNeilly RE, Coppolino MG. SNAP23, Syntaxin4, and vesicle-associated membrane protein 7 (VAMP7) mediate trafficking of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) during invadopodium formation and tumor cell invasion[J]. *Mol Biol Cell*, 2014, 25(13):2061-2070.
- [10] 江州华, 吴生华, 李小强, 等. Wnt5a, MMP2 和 MMP14 在胃癌中的表达及其对临床病理特征的影响[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2010, 17(10):1077-1082.
- [11] He L, Chu D, Li X, et al. Matrix metalloproteinase-14 is a negative prognostic marker for patients with gastric cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(5):1264-1270.
- [12] Zheng L, Li D, Xiang X, et al. Methyl jasmonate abolishes the migration, invasion and angiogenesis of gastric Cancer cells through down-regulation of matrix metalloproteinase 14[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13(74):1471-2407.
- [13] Dong Z, Xu X, Du L, et al. Leptin-mediated regulation of MT1-MMP localization is KIF1B dependent and enhances gastric cancer cell invasion[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(5):974-983.
- [14] Zhang F, Chen A, Chen J, et al. SiRNA-mediated silencing of beta-catenin suppresses invasion and chemosensitivity to doxorubicin in MG-63 osteosarcoma cells [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2011, 12(1):239-245.
- [15] Liu P, Yang J, Pei J, et al. Regulation of MT1-MMP activity by β -catenin in MDCK non-cancer and HT1080 Cancer cells[J]. *J Cell Physiol*, 2010, 225(3):810-821.
- [16] Akla N, Pratt J, Annabi B. Concanavalin-A triggers inflammatory response through JAK/STAT3 signalling and modulates MT1-MMP regulation of COX-2 in mesenchymal stromal cells[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(19):2498-2506.
- [17] Poincloux R, Lizárraga F, Chavrier P. Matrix invasion by tumour cells: a focus on MT1-MMP trafficking to invadopodia[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(17):3015-3024.

(收稿日期:2014-10-08 修回日期:2014-12-12)

(上接第 1363 页)

- Rev, 1996, 54(1 Pt 2):59-65.
- [3] 金科美, 李冬, 华金中. 小型营养评价法评价老年病人营养状况[J]. *浙江预防医学*, 2004, 16(1):46-47.
- [4] 陈艳秋, 孙建琴, 宗敏, 等. 微型营养评定法(MNA)在老年住院患者中应用的探讨[J]. *老年医学与保健*, 2006, 12(1):39-41.
- [5] 余艳, 刘雪琴. 微型营养评定法在老年住院患者中的应用研究[J]. *护士进修杂志*, 2012, 27(3):260-261.
- [6] 刘敬武. 微型营养评价法在肿瘤病人营养不良中的应用[D]. 北京:中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
- [7] 于康, 陈伟. 外科老年住院患者的营养状况评定[J]. *营养学报*, 1999, 21(2):96-99.
- [8] 王楠, 王玉梅, 刘雪梅, 等. 住院患者营养风险、营养不良发生率及营养现状的评估分析[J]. *职业与健康*, 2013, 29(19):2424-2426.
- [9] 张静, 陈格亮, 花超, 等. 内科老年患者营养风险筛查及营养支持使用情况分析[J]. *世界临床药物*, 2013, 34(6):356-358, 368.
- [10] 孙惠杰, 赵英凯, 赵勇, 等. 老年长期住院患者营养不良和营养风险评估分析[J]. *中外医学研究*, 2013, 11(22):139.
- [11] 于康. 应用 MNA 综合评定法及人体组成分析评定外科住院患者营养状况[J]. *肠外与肠内营养*, 2000, 7(4):254.
- [12] 唐普贤. 全国大医院老年住院患者营养状况调查[D]. 北京:协和医学院中国医学科学院, 2012.
- [13] 张继红, 黄蕾, 宋宝梅, 等. 心血管内科老年住院患者营养风险分析及护理[J]. *护理学报*, 2011, 18(18):32-34.
- [14] 朱跃平, 丁福, 刘欣彤, 等. 老年住院患者营养风险筛查及营养支持状况[J]. *中国老年学杂志*, 2013, 33(11):2609-2611.
- [15] 郑欣. 普外科住院患者营养风险筛查及临床结局分析[D]. 天津:天津医科大学, 2013.

(收稿日期:2014-10-15 修回日期:2014-12-10)