

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.17.017

## NGAL 及 MMP9 在原发性肝癌患者血清中表达及意义

唐成佳,余天雾<sup>△</sup>

(重庆医科大学附属永川医院肝胆外科,重庆永川 404000)

**[摘要]** **目的** 探讨原发性肝癌(PHC)患者血清中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)及基质金属蛋白酶 9(MMP9)的变化及临床意义。**方法** 采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测 47 例 PHC 患者(PHC 组)及 19 例健康体检者健康血清中 NGAL 及 MMP9 水平,并分析二者与临床病理的联系,同时使用 ROC 曲线分析二者对 PHC 的诊断价值,Kaplan-Meier 生存曲线分析不同 NGAL、MMP9 水平的生存差异。**结果** PHC 组 NGAL、MMP9 水平明显高于健康体检者对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );NGAL 及 MMP9 的水平在 III~IV 期组高于 I~II 期,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );血清 MMP9、NGAL 检测灵敏度分别为 70.2%和 83.0%。二者联合检测可提高灵敏度至 94.9%。Kaplan-Meier 生存分析发现血清 NGAL 水平高患者预后差。**结论** PHC 患者血清 NGAL 及 MMP9 与 PHC 的发生、发展密切相关;联合检测血清水平 NGAL 及 MMP9 可明显提高敏感度,对 PHC 诊断及预后指标有一定的价值。

**[关键词]** 原发性肝癌;中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白;基质金属蛋白酶 9

**[中图分类号]** R735.7

**[文献标识码]** A

**[文章编号]** 1671-8348(2016)17-2357-03

## Detection of peripheral NGAL and MMP9 levels and its clinical significance in primary hepatic carcinoma

Tang Chengjia, Yu Tianwu<sup>△</sup>

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Yongchuan Hospital of Chongqing Medical University, Yongchuan, Chongqing 404000, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the changes of matrix metalloproteinase 9(MMP9) and neutrophil gelatinase associated lipocalin(NGAL) in primary hepatic carcinoma and its clinical significance. **Methods** Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum level of MMP9 and NGAL in 47 patients with primary hepatic carcinoma and 19 healthy controls. The association between serum MMP9 and NGAL levels with the clinicopathological features of hepatic carcinoma were evaluated, ROC curves were used to analyze the influence of MMP9 and NGAL on the diagnostic value, Kaplan-Meier method was used to evaluate the relationship between the expressions of NGAL and MMP9 and the prognosis of patients with HCC. **Results** Serum MMP9 and NGAL levels in hepatic carcinoma patients are significantly higher compared with normal controls ( $P \leq 0.05$ ). The serum level of MMP9 and NGAL in primary hepatic carcinoma was positively correlated with TNM stage ( $P \leq 0.05$ ). The sensitivity and specificity of MMP9 and NGAL for primary hepatic carcinoma were 70.2% and 83.0%. The sensitivity of the joint detection were 94.9%. Kaplan Meier survival curves showed that cumulative survival rates of patients with positive expression of NGAL were significantly lower than those of patients with negative expression. **Conclusion** MMP9 and NGAL might play an important role in gastric cancer generation and development. Monitoring of serum MMP9 and NGAL levels might be helpful for diagnosis and evaluation of prognosis for primary hepatic carcinoma.

**[Key words]** primary hepatic carcinoma; NGAL; matrix metalloproteinase 9

原发性肝癌(primary hepatic carcinoma, PHC)是指肝内原发而非转移的肝脏恶性肿瘤。PHC 发生率占全部恶性肿瘤的 5%,世界范围内每年大约 100 万人受 PHC 的影响,其病死率与患病率几乎相同。中国是 PHC 的发病率高的地区之一,达到全球的 50%以上,PHC 的病死率高,病死率及患病率均排在消化系恶性肿瘤的第 2 位,术后 5 年生存率平均仅为 20%左右。

中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)是 Kjeldsen 等<sup>[1]</sup>于 1993 年在研究人中性粒细胞中基质金属蛋白酶 9(MMP9)时发现的,属于 Lipocalin 家族成员。近年来研究发现,NGAL 与多种肿瘤如胃癌、乳腺癌、结肠癌的发生、发展有关,在上述肿瘤中均发现 NGAL 高表达且与肿瘤浸润、转移或预后有关。而 NGAL 在肝癌中的表达情况,国内外鲜见相关报道,本研究采用酶联免疫吸附测定(ELISA)检测肝癌患者血清中 NGAL 及 MMP9 的表达情况,并分析二者与临床病理的

联系。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2009 年 3 月至 2010 年 3 月在本院肝胆外科就诊的 47 例 PHC 患者(PHC 组)的血清,其中男 24 例,女 23 例,年龄 40~85 岁,平均年龄 63.2 岁,高分化 17 例,低分化 30 例,均在术前收集,所有诊断均经病理切片证实;同时收集本院体检科 19 例健康体检人员血清作为健康对照组,所有入组人员均告知检查目的,并签署知情同意书。PHC 的诊断符合中国抗癌协会肝癌专业委员会修订的 PHC 的临床诊断与分期标准。采用一次性无菌肝素化的玻璃试管收集每位入组病例晨起空腹静脉血 3 mL,3 000 r/min×10 min,取上清液分装于无菌玻璃试管中置于-70℃冰箱中冻存备用。

**1.2 主要试剂** 人 NGAL ELISA 检测试剂盒、人 MMP9 ELISA 试剂盒均购于武汉博士德公司;酶标仪购于 Thermo 公司。

### 1.3 方法

**1.3.1 ELISA 检测 PHC 患者血清 NGAL、MMP9 表达**  
ELISA 检测参照试剂盒说明书进行。从  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出待测血清标本,室温下解冻,配置标准品,加样,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  温育 30 min。洗涤液充分洗涤 4~6 次,加酶,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  温育 30 min,洗涤 4~6 次,加入显色剂 A 及 B 液各  $50\text{ }\mu\text{L}$ ,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光显色 15 min,每孔加终止液,以空白孔调零,终止后 15 min 内,于酶标仪中  $405\text{ nm}$  波长测量各孔的吸光度(OD)值,并绘制标准曲线,计算各待测孔中样品浓度。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS18.0 统计软件进行分析。计量材料以  $\bar{x}\pm s$  表示,两组间均数的差异比较采用两独立样本  $t$  检验,采用受试者工作特征曲线(ROC)判断血清 MMP9 与 NGAL 诊断 PHC 的最佳临界值。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组血清 NGAL 及 MMP9 水平比较** PHC 组 NGAL、MMP9 水平为  $(31.9\pm 9.0)\text{ ng/mL}$ 、 $(336.1\pm 85.7)\text{ ng/mL}$  明显高于健康对照组  $(18.0\pm 8.6)\text{ ng/mL}$ 、 $(190.0\pm 62.4)\text{ ng/mL}$ ,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。

**2.2 PHC 患者血清 NGAL 及 MMP9 表达与临床病理的联系**  
随着 PHC TNM 分期的增加,NGAL 及 MMP9 的表达率也逐渐增加,NGAL 及 MMP9 的水平在 III~IV 期为  $(33.6\pm 7.8)\text{ ng/mL}$ 、 $(357.5\pm 85.2)\text{ ng/mL}$ ,高于 I~II 期  $(27.4\pm 8.4)\text{ ng/mL}$ 、 $(291.2\pm 82.4)\text{ ng/mL}$ ,差异有统计学意义( $P<0.05$ );NGAL 及 MMP9 的水平与患者的年龄、性别、肿瘤发生部位及肿瘤大小、分化程度等比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

**2.3 ROC 曲线分析** 血清 MMP9 和 NGAL 的曲线下面积分别为 0.890 和 0.864,血清 MMP9 对 PHC 诊断价值略高于 NGAL。血清 MMP9 最佳临界值为  $268.50\text{ ng/mL}$ ,灵敏度和特异度分别为 70.2% 和 94.7%;血清 NGAL 最佳临界值为  $24.50\text{ ng/mL}$ ,灵敏度和特异度分别为 83.0% 和 78.9%。联合检测受试者血清 MMP9 和血清 NGAL 中任一检测结果为阳性即为患者。联合检测可提高灵敏度至 94.9%,但特异度降低至 74.7%。

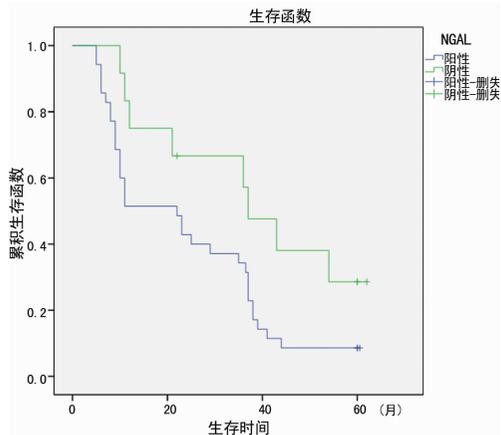


图 1 不同血清 NGAL 水平的 PHC 患者的生存曲线

**2.4 生存分析** 对 47 例 PHC 患者进行 5 年随访调查,以血清  $\text{NGAL}\geq 24.50\text{ ng/mL}$ ,  $\text{MMP9}\geq 268.50\text{ ng/mL}$  为阳性;血清中  $\text{NGAL}<24.50\text{ ng/mL}$ ,  $\text{MMP9}<268.50\text{ ng/mL}$  为阴性。进行 Kaplan-Meier 生存分析, MMP9、NGAL 阳性组及阴性组患者的中位生存期分别为 22.0、37.0 个月。生存曲线显示 NGAL 阳性表达者的生存时间明显低于阴性表达( $P<0.05$ ),而 MMP9 水平与患者生存时间无明显相关性( $P>0.05$ ),见

图 1、2。

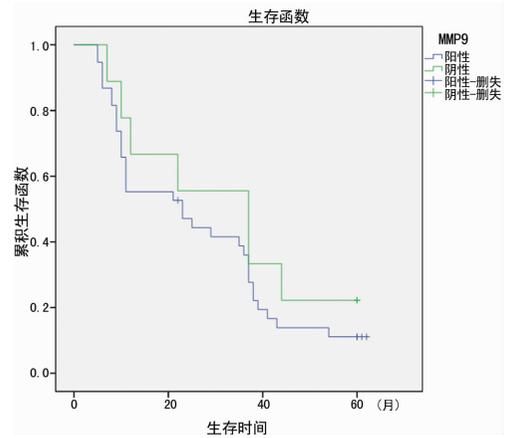


图 2 不同血清 MMP9 水平的肝癌患者的生存曲线

## 3 讨论

我国是世界上的肝癌大国,肝癌患者总数占世界肝癌患者的 55%<sup>[2]</sup>,其病死率达 26.26/100 000。肿瘤的侵袭和转移是导致患者死亡的重要原因。

肿瘤发生侵袭转移细胞外基质的降解是首要条件。基质金属蛋白酶(MMPs)是一组能够降解细胞外基质和基底膜成分的重要蛋白水解酶, MMP9 又称明胶酶 B(gelatinase B) 作为 MMPs 家族中的重要一员。可与 MMP9 形成复合物,拮抗 TIMP-1 对 MMP9 的抑制作用,从而增加 MMP9 的活性,促进对细胞外基质的降解。此外, MMP9 还可以促使血管内皮生长因子(VEGF)释放,增加肿瘤血管生成,促进肿瘤侵袭转移<sup>[3-4]</sup>。本研究发现,血清中 MMP9 水平在 PHC 组明显高于健康对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且与肿瘤的临床分期密切相关,说明 MMP9 在肿瘤发生、发展中起着重要作用。

NGAL 是在研究 MMP9 时发现的小分子蛋白,属于脂质运载蛋白超家族<sup>[1]</sup>,其基因定位于染色体 9q34 上,全长为 5 869 bp,其中包括 1 659 bp 的 5'端非转录区,178 bp 的 3'端非转录区,以及 3 696 bp 的原初转录区<sup>[5]</sup>。NGAL 蛋白具有脂质运载蛋白家族的典型  $\beta$ -折叠桶( $\beta$ -barrel)结构,它由连续氢键连接的 8 段反向平行的  $\beta$  折叠链构成的,其封闭端的  $\beta_4\sim\beta_5$  环上有游离的巯基(C87),可与 MMP9 等蛋白分子形成二硫键,形成异源二聚体,再与金属蛋白酶组织抑制剂(TIMP-1)形成 NGAL/MMP9/TIMP-1 三元复合物,从而调节 MMP9 等分子的活性<sup>[6]</sup>。

近年研究发现,NGAL 与多种肿瘤如胃癌、乳腺癌、结肠癌的发生、发展有关。Zhang 等<sup>[7]</sup>已使用免疫组织化学法检测了 138 例肝癌患者组织中 NGAL 及其受体的表达。发现肝癌患者组织中 NGAL 及受体表达明显高于癌旁组织,二者表达与肿瘤的不良预后密切相关。Wang 等<sup>[8]</sup>也发现胃癌组织中 NGAL 表达明显高于正常癌旁组织,其表达与肿瘤大小、Lauren's 分级、淋巴结转移及血管浸润有关。而也发现患者血清中 NGAL 表达与临床病理分期有关,同时发现血清中 NGAL 表达比 CA199 和 CEA 更具有标志性,与患者预后更相关。而结肠癌 NGAL 基因的表达是否参与肿瘤浸润、转移尚不明确, Hu 等<sup>[9]</sup>认为, NGAL 可通过 MMP9 依赖及非 MMP9 依赖(铁依赖减少 E-cadherin)的机制,减弱细胞间黏附,促进肿瘤血管形成、浸润和远处转移。本研究发现,血清中 NGAL 水平与临床病理分期密切相关,提示 NGAL 可能参与了肿瘤的浸润与转移,但也有人发现 NGAL 高表达于结肠癌

组织中,但其淋巴结转移灶却未见表达,认为 NGAL 在转移过程中作用可能没有发挥主要作用<sup>[10]</sup>,在体外试验中,异常表达的 NGAL 可抑制结肠癌细胞的浸润及肝转移<sup>[11]</sup>,NGAL 可能不能作为腺瘤癌变的标志物<sup>[12]</sup>。

本研究提示,PHC 组 NGAL 及 MMP9 水平明显高于健康对照组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。Ⅲ~Ⅳ期 NGAL、MMP9 水平明显高于 I~II 期,经长期随访调查显示,血清中 NGAL 阳性的肝癌患者的生存率低于 NGAL 阴性的 PHC 患者,NGAL 阳性患者的中位生存期明显低于 NGAL 阴性,提示血清中 NGAL 水平与患者的预后密切相关。血清 MMP9 水平与患者生存时间无明显相关性,可能与样本量偏小有关。ROC 分析得出,单独检测血清 NGAL、MMP9 水平,其敏感度均较低,二者联合检测可明显提高其敏感度,而其特异度有所下降,可能由于血清 MMP9 和 NGAL 可在多种肿瘤中异常表达,故缺乏对于 PHC 特异性,但二者作为诊断及判断 PHC 预后的指标仍有一定的价值。

### 参考文献

- [1] Kjeldsen JA. Primary structure of NGAL. A novel protein associated with human neutrophil gelatinase[J]. *J Biol Chem*, 1993, 268(14): 10425-10432.
- [2] Hepatol JG. Prevention of hepatocellular carcinoma in the Asia-Pacific region: consensus statements[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2010, 25(4): 657-663.
- [3] Nagase H, Visse R, Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 69(3): 562-573.
- [4] Flannery CR. MMPs and ADAMTSs: functional studies [J]. *Front Biosci*, 2006(11): 544-569.
- [5] Cowland JB, Borregaard N. Molecular characterization and pattern of tissue expression of the gene for neutrophil ge-

latinase-associated lipocalin from humans[J]. *Genomics*, 1997, 45(1): 17-23.

- [6] Coles M, Diercks T, Muehlenweg B, et al. The solution structure and dynamics of human neutrophil gelatinase-associated lipocalin[J]. *J Mol Biol*, 1999, 289(1): 139-157.
- [7] Zhang Y, Fan Y, Mei Z. NGAL and NGALR overexpression in human hepatocellular carcinoma toward a molecular prognostic classification. [J]. *Cancer Epidemiology*, 2012, 36(5): 294-299.
- [8] Wang HJ, He XJ, Ma YY, et al. Expressions of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in gastric cancer: a potential biomarker for prognosis and an ancillary diagnostic test [J]. *Anat Rec (Hoboken)*, 2010, 293(11): 1855-1863.
- [9] Hu L, Hittelman W, Lu T, et al. NGAL decreases E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and increases cell motility and invasion through Rac1 in colon carcinoma cells[J]. *Lab Invest*, 2009, 89(5): 531-548.
- [10] Candido S, Maestro R, Polesel J, et al. Roles of neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL) in human cancer [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(6): 1576-1594.
- [11] Lee HJ, Lee EK, Lee KJ, et al. Ectopic expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin suppresses the invasion and liver metastasis of colon cancer cells[J]. *Int J Cancer*, 2006, 118(10): 2490-2497.
- [12] Mclean MH, Thomson AJ, Murray GI, et al. Expression of neutrophil gelatinase-associated lipocalin in colorectal neoplastic progression: a marker of malignant potential? [J]. *Br J Cancer*, 2013, 108(12): 2537-2541.

(收稿日期: 2015-12-12 修回日期: 2016-02-02)

(上接第 2356 页)

综上所述,随着我国人口老龄化问题日益多样化、严峻化,心血管疾病在老年人群的发病率也呈逐年递增的态势,其中 CHD 对老年人群的危害性日渐加重。APN 与冠状动脉粥样硬化有关,可做冠状动脉粥样硬化的一个预测因子。而 NT-proBNP 水平升高与心室扩张、重构、功能紊乱及死亡相关,是 CHD 患者一个特异性较好的监测指标,也是早期危险分层的独立预测因子,两者结合起来可能对 CHD 的诊断及预后判断具有重要意义。从而可能为老年 CHD 的防治及预后判断、评估病情提供一定的依据。

### 参考文献

- [1] 金静,彭道泉,龚浩,等.血清脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白及脂联素水平与冠心病的相关性[J]. *中华心血管杂志*, 2010, 38(8): 706-710.
- [2] Cakir Z, Saritas A, Emet M, et al. A prospective study of brain natriuretic peptide levels in three subgroups: Stroke with hypertension, stroke without hypertension, and hypertension alone[J]. *Ann Indian Acad Neurol*, 2010, 13(1): 47-51.
- [3] 刘雅,刘阔,楼煜清,等.冠心病经皮冠脉介入治疗患者 N 末端脑钠肽前体水平与冠脉病变严重程度的相关性研究[J]. *中国全科医学*, 2011, 14(16): 1785-1788.

- [4] Scherer PE, Williams S, Fogliano M, et al. A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(45): 26746-26749.
- [5] Kumada M, Kihara S, Sumitsuji S, et al. Association of hypoalbuminemia with coronary artery disease in men [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2003, 23(1): 85-89.
- [6] Arita Y, Kihara S, Ouchi N, et al. Adipocyte-derived plasma protein adiponectin acts as a platelet-derived growth factor-BB-binding protein and regulates growth factor-induced common postreceptor signal in vascular smooth muscle cell[J]. *Circulation*, 2002, 105(24): 2893-2898.
- [7] Kobashi C, Urakaze M, Kishida M, et al. Adiponectin inhibits endothelial synthesis of interleukin-6 [J]. *Cite Res*, 2005, 97(12): 1245-1252.
- [8] 陈然,黄红光,戴海鹰,等.冠心病患者血清脂联素水平的检测及意义[J]. *中国医师杂志*, 2010, 12(11): 1548-1550.
- [9] Richards AM, Nicholis MG, Buttimore RC, et al. Neuroendocrine prediction of left ventricular function and heart failure after acute myocardial infarction[J]. *Circulation*, 1997, 96(8S): 2182.

(收稿日期: 2015-11-08 修回日期: 2016-02-26)