

乙酰肝素酶、MMP-9在膀胱移行细胞癌侵袭转移中的表达相关性及其临床意义

陈芳¹, 李丽²

1. 河南大学淮河医院肾内科, 河南开封 475001; 2. 河南大学护理学院, 河南开封 475001

[摘要] 目的: 检测乙酰肝素酶(heparanase, HPA)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在膀胱移行细胞癌、正常膀胱组织中的表达及相互关系, 分析其与临床预后及浸润转移的关系。方法: 应用免疫组化 SP 法检测 92 例膀胱移行细胞癌和 10 例正常膀胱组织中 HPA、MMP-9 的表达水平, 分析两者的表达与临床病理指标的关系, 建立 Pearson 等级相关分析。结果: HPA 在膀胱移行细胞癌中的表达明显高于正常膀胱组织(77.2%, 0; $P < 0.05$), HPA 阳性表达与周围组织浸润($\chi^2=11.918$, $P < 0.05$)、淋巴结转移($\chi^2=5.380$, $P < 0.05$)有关, 与性别、年龄、组织学分级及 1 年生存率无关($P > 0.05$); 膀胱移行细胞癌组织中 MMP-9 表达明显高于正常膀胱组织(70.7%, 20.0%; $P < 0.05$), 且 MMP-9 阳性表达与周围组织浸润($\chi^2=4.329$, $P < 0.05$)、远处转移($\chi^2=10.301$, $P < 0.05$)有关, 与性别、年龄、组织学分级及 1 年生存率无关($P > 0.05$)。HPA 与 MMP-9 有较高的共同阳性表达率($P=0.018$)。HPA 和 MMP-9 表达呈正相关($r=0.729$, $P < 0.05$), 其共同表达率与肿瘤对周围脏器浸润和淋巴结转移有相关性($P < 0.05$)。结论: HPA、MMP-9 在膀胱移行细胞癌组织中的表达可能与膀胱移行细胞癌浸润、转移相关, 可作为新的膀胱移行细胞癌标记物用于联合检测, 具有重要的临床意义。

[关键词] 乙酰肝素酶; 基质金属蛋白酶-9; 膀胱移行细胞癌

[中图分类号] R737.14

[文献标识码] A

[文章编号] 1673-7210(2012)01(a)-022-03

HPA and MMP-9 in the expression of invasion and metastasis of bladder transitional cell carcinoma and clinical significanc

CHEN Fang¹, LI Li²1. Department of Nephrology, the Huaihe Hospital of He'nan University, He'nan Province, Kaifeng 475001, China;
2. College of Nursing, He'nan University, He'nan Province, Kaifeng 475001, China

[Abstract] Objective: To investigate the expression of heparanase and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), and their correlations with the metastasis and prognosis of bladder transitional cell carcinoma. **Methods:** Immunohistochemical staining (SP method) was used to measure HPA and MMP-9 expression in 92 cases of bladder transitional cell carcinoma and 10 cases of normal pancreas. Correlations of the expression of HPA and MMP-9 to clinicopathologic features were analyzed. Pearson regress ionmodel was used to analyze. **Results:** The expression of HPA in bladder transitional cell carcinoma was significantly higher than that in normal bladders (77.2%, 0; $P < 0.05$), the HPA protein intensive expression was associated with the infiltration of other tissue ($\chi^2=11.918$, $P < 0.05$) and lymph nodemetastasis ($\chi^2=5.380$, $P < 0.05$), whereas there were no relation with gender, age, histological grade and 1-year postoperative survival ($P > 0.05$); the expression of MMP-9 in bladder transitional cell carcinoma was significantly higher than that in normal bladders (70.0%, 20.0%; $P < 0.05$), the MMP-9 protein intensive expression was associated with the infiltration of other tissue ($\chi^2=4.329$, $P < 0.05$) and lymph node metastasis ($\chi^2=10.301$, $P < 0.05$), whereas there were no relation with gender, age, tumor differentiation and 1-year post-operative survival ($P > 0.05$). HPA and MMP-9 expression had a higher positive rate in bladder transitional cell carcinoma ($P=0.018$). The positive expressions of HPA and MMP-9 was correlated in the bladder transitional cell carcinoma ($r=0.729$, $P < 0.05$). **Conclusion:** HPA and MMP-9 may be associated with the infiltration and metastasis of the bladder transitional cell carcinoma. HPA and MMP-9 may be important features of cancer of bladder. A combined detection of them may benefit us in prediction of the progression of bladder transitional cell carcinoma.

[Key words] Heparanase; Matrix metalloproteinase-9; Bladder transitional cell carcinoma

膀胱移行细胞癌 (bladder transitional cell carcinoma, BTCC) 是泌尿系常见的恶性肿瘤, 其特点是易复发和易侵袭转移。因此积极寻求膀胱肿瘤的特殊标志物成为膀胱癌无创检查和治疗的极有价值的方法。新近研究发现乙酰肝素酶 (heparanase, HPA) 也称作乙酰肝素酶或类肝素酶, 其能够酶解基底膜 (basement membrane, BM) 和细胞外基质 (extracel-

lular matrix, ECM) 中的硫酸乙酰肝素蛋白聚糖成分, 从而参与肿瘤侵袭转移过程。因此, HPA 成为近几年肿瘤研究新热点^[1]。肿瘤细胞的浸润转移是一个复杂过程, 其中最重要的一步是降解细胞外基质及基底膜, 这一步骤主要依赖于蛋白水解酶。MMPs (matrix metalloproteniase) 就是这种锌离子依赖性内肽酶, 它能降解细胞外基质所有成分, MMP-9 是 MMPs 中降

解基底膜最重要的蛋白酶之一。MMP-9 主要降解以 型胶原为主的基底膜屏障,对于肿瘤形成是非常重要的^[2]。本研究采用免疫组化法检测膀胱移行细胞癌和正常膀胱组织中的 HPA 和 MMP-9 的表达情况,以探讨二者在膀胱移行细胞癌中的表达和相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料

病例取自 2005~2010 年我院膀胱移行细胞癌手术(经开放性膀胱肿瘤全切或部分切除及经尿道膀胱肿瘤电切患者)病例共 92 例,其中,男 58 例,女 34 例;年龄 38~89 岁,平均 61.8 岁。全部病例均经组织病理学诊断为膀胱移行细胞癌。组织学分级:高分化腺癌 45 例,中分化腺癌 36 例,低分化腺癌 11 例;另外同期选取 34 例正常膀胱组织作为对照(因输尿管癌或肾盂癌而行膀胱部分切除的正常膀胱组织,经病理证实膀胱无肿瘤细胞)。组织均经福尔马林固定,常规石蜡包埋。

1.2 方法

采用免疫组化链酶抗生物素蛋白-过氧化物酶(SP)法。兔抗人 HPA 单克隆抗体、兔抗人 MMP-9 单克隆抗体、均购自武汉博士德生物工程有限公司;兔抗 SP 试剂盒、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。用已知的膀胱移行细胞癌阳性片作为阳性对照,以 0.05 mol/L PBS 液代替一抗作为阴性对照。HPA 和 MMP-9 均以细胞胞浆中有清晰棕黄色或棕褐色颗粒为阳性。阳性结果判定标准:染色切片中计数每 10 个高倍视野阳性细胞百分率,阳性细胞率 $\geq 70\%$ 为强阳性(+++)病例,50%~69%为阳性(++)病例,30%~49%为弱阳性(+)病例,<30%为阴性病例^[3]。

1.3 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 11.0 统计软件包处理,统计方法采用 χ^2 检验、Pearson 相关分析等处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPA 在正常膀胱和膀胱移行细胞癌中的表达

HPA 蛋白呈棕黄色或棕褐色颗粒,团块状分布,主要位

于肿瘤细胞胞浆内。HPA 在膀胱移行细胞癌组织阳性率为 77.2%(71/92),多数为“+~++”表达(61/92);10 例正常膀胱组织中均呈“-”表达(0/10)。HPA 在膀胱移行细胞癌组织中表达阳性率明显高于正常膀胱组织($P<0.05$)。

2.2 HPA 蛋白表达与 BTCC 临床病理学因素的相关性

HPA 蛋白在 BTCC 中的表达与性别、年龄、组织学分级及 1 年存活率无关,而与患者周围脏器浸润、淋巴结转移有关($P<0.05$)。见表 1。

2.3 MMP-9 蛋白在正常膀胱和 BTCC 中的表达

MMP-9 蛋白呈棕黄色或棕褐色颗粒,阳性细胞主要位于肿瘤细胞胞浆内。MMP-9 在 BTCC 中表达阳性率为 70.7%(65/92),多数为“+~++”表达(46/92);10 例正常膀胱组织中有 2 例呈“+”表达(2/10)。HPA 在 BTCC 中表达阳性率明显高于正常膀胱组织($P<0.05$)。

2.4 BTCC 组织中 MMP-9 的表达和临床病理指标的关系

MMP-9 在 BTCC 中的表达与性别、年龄、组织学分级及 1 年存活率无关,而与患者周围脏器浸润、淋巴结转移有关($P<0.05$)。见表 2。

2.5 HPA 和 MMP-9 的相关性

HPA 表达阳性率高的患者其 MMP-9 的表达也显著升高,经 Spearman 等级相关性检验分析,在 BTCC 中 HPA 和 MMP-9 常常联合表达,两者具有相关性($r=0.729, P<0.05$)。

3 讨论

膀胱移行细胞癌 90%具有浸润性生长、容易复发、易侵袭转移等生物学特性^[4]。膀胱癌治疗关键仍然是早期诊断。总之临床需要有良好的判断指标和合理的治疗靶点。肿瘤侵袭转移是一个多步骤的、序贯的复杂过程。MMP-9 和 HPA 均参与恶性肿瘤的侵袭转移,是其恶性生物学潜能的主要调节蛋白^[5]。HPA 能特异性破坏细胞外基质和基底屏障,从而促进恶性肿瘤浸润转移。目前国内外有关报道显示,乙酰肝素酶可能成为肿瘤治疗的一个新靶点^[6]。且其可通过降解硫酸乙酰肝素糖蛋白,改变细胞外基质和基底膜结构,促进肿瘤细胞侵袭转移。本研究结果发现 HPA 在有周围脏器浸润及有淋巴结转移的 BTCC 患者中明显高于无浸润无转移

表 1 BTCC 中 HPA 的表达与临床病理学因素的相关性

参数	例数	HPA(例)				阳性率(%)	χ^2 值	P 值
		-	+	++	+++			
性别	男	58	13	11	28	77.6	0.015	>0.05
	女	34	8	9	13	76.5		
年龄	≥ 60 岁	39	7	8	19	82.1	0.914	>0.05
	<60 岁	53	14	12	22	73.6		
组织学分级		11	2	6	2	81.8	0.209	>0.05
		36	8	9	13	77.8		
		45	11	5	26	75.6		
周围脏器浸润	有	56	6	15	27	89.3	11.918	<0.05
	无	36	15	5	14	58.3		
淋巴结转移	有	51	7	14	23	86.3	5.380	<0.05
	无	41	14	6	18	65.9		
生存时间	>1 年	28	3	7	13	89.3	3.352	>0.05
	≤ 1 年	64	18	13	28	71.9		

表 2 膀胱移行细胞癌组织中 MMP-9 的表达与临床病理特征的关系

参数	例数	MMP-9(例)				阳性率(%)	χ ² 值	P 值
		-	+	++	+++			
性别	男	58	16	12	21	9	72.4	0.235
	女	34	11	3	10	10	67.6	
年龄	≥60 岁	39	9	6	19	5	76.9	1.284
	<60 岁	53	18	9	12	14	66.0	
组织学分级		11	4	1	4	2	63.6	0.308
		36	10	7	10	9	72.2	
		45	13	7	17	8	71.1	
周围脏器浸润	有	56	12	11	24	9	78.6	4.329
	无	36	15	4	7	10	58.3	
淋巴结转移	有	51	8	13	23	7	84.3	10.301
	无	41	19	2	8	12	53.7	
生存时间	>1 年	28	5	7	10	6	82.1	2.563
	≤1 年	64	22	8	21	13	65.6	

者。MMPs 目前已发现了至少 26 个成员,其中 MMP-9 主要降解明胶从而导致肿瘤细胞向周围组织浸润转移。有资料显示 MMP-9 不仅参与 ECM 的降解,而且还对肿瘤细胞的黏附能力有影响^[7]。通常 MMP-9 以酶原形式在细胞内合成并最终被分泌到细胞外,改变分子构型后被激活,能降解多种细胞外基质成分,其中对 ECM 的降解和破坏是其中最关键的一步。大量研究表明,MMP-9 在多种恶性肿瘤中呈现过度表达,在恶性肿瘤浸润转移过程中扮演着重要角色。本文显示 MMP-9 在 BTCC 中的表达与肿瘤侵犯周围脏器、淋巴结转移有密切关系^[8-9]。本文说明 MMP-9 在 BTCC 的发生发展过程中起重要作用,且 MMP-9 阳性表达可作为 BTCC 浸润转移的重要分子标志之一^[10]。目前关于 HPA 与 MMP-9 关系的研究尚不统一^[11]。本研究同时证实 HPA 与 MMP-9 在 BTCC 浸润转移过程中有明显协同作用。因此,联合检测二者表达不仅可以作为早期发现和判断膀胱移行细胞癌的有效方法,同时还可作为评价膀胱移行细胞癌预后的重要指标。总之,HPA 和 MMP-9 在膀胱移行细胞癌组织中共同表达增高,并均与肿瘤浸润转移过程相关,表明其可作为预测膀胱移行细胞癌的临床联合检测指标。

[参考文献]

[1] 李琨,李明昌,陆永建.乙酰肝素酶基因在 U251 胶质瘤细胞株中的表达[J].实用医学杂志,2007,23(13):1959-1961.
[2] Somiari S B, Somiari R I, Heckman C M, et al. Circulating MMP-2 and MMP-9 in breast cancer-potential role in classification of patients into low risk, high risk, benign disease and breast cancer categories [J]. Int J Cancer,2006,119(6):1403-1411.

[3] Mendes O, Kim H T, Stoica G. Expression of MMP-2, MMP-9 and MMP-13 in breast cancer brain metastasis in a rat model [J]. Clin Exp Metastasis,2005,22(3):237-246.
[4] 曾轶晖.基因治疗胰腺癌的研究[J].中国医药导报杂志,2009,6(7):156-159.
[5] Gorogh T, Beier UH, Baumken J, et al. Metalloproteinases and their inhibitors: influence on tumor invasiveness and metastasis formation in head and neck squamous cell carcinomas [J]. Head Neck,2006,28(1): 31-39.
[6] Baraz L, Haupt Y, Elkin M, et al. Tumor suppressor p53 regulates heparanase gene expression [J]. Oncogene,2006,25(28):3939-3947.
[7] Zhang S, Li L, Lin JY, et al. Imbalance between expression of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in invasiveness and metastasis of human gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol,2003,9(5):899-904.
[8] 胡忠良,文继舫,沈明,等.TGIF,MMP9 和 蛋 VEGF 白在胃癌中的表达及临床病理联系[J].中南大学学报,2006,31(1):76-80.
[9] Matsumura S, One N, Nakayama H, et al. A single nucleotide polymorphism in the MMP-9 promoter affects tumor progression and invasive phenotype of gastric cancer [J]. J Cancer Res Clin Oncol,2005,131(1): 19-25.
[10] O'Grady A, Dunne C, O'Kelly P, et al. Differential expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2, MMP-9 and tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP)-1 and TIMP-2 in non-melanoma skin cancer: implications for tumour progression [J]. Histopathology,2007,51(6):793-804.
[11] 范钰,王崇强,张振水,等.基质金属蛋白酶 7mRNA 在胰腺癌组织中表达的临床意义[J].齐齐哈尔医学院学报,2008,29(1):4-6.

(收稿日期:2011-05-13)

(上接第 8 页)

期的影响[J].中华结核和呼吸杂志,2001,24(11):663-665.
[12] 夏寿萱.放射生物学[M].北京:军事医学科学出版社,1998:90-91.
[13] Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immuno Meth, 1983,65(1-2):55-63.
[14] Hoff DD, Casper J, Bradier E, et al. Association between human tumor colony-forming assay results and response of an individual patient's tumor to chemotherapy [J]. Am J Med,1981,70(5):1027-1041.

[15] 王宝成,李志,郭军,等.TAM 对非小细胞肺癌经 NVB-DDP 方案诱导耐药性逆转的临床观察[J].中国肿瘤临床,2003,30(9):656.
[16] Fertl B, Malaise EP. Intrinsic radiosensitivity of human cell lines is correlated with radioresponsiveness of human tumors: analysis of 101 published survival curves [J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys,1985,14 (11):1699-1706.
[17] Williams M, Lyu M, Yang Y, et al. IER5, a novel member of the slow kinetics immediate-early genes [J]. Genomics,1999,55(3):327-334.

(收稿日期:2011-08-02)