

食管鳞癌 MMP-2 和 CD44v6 表达与侵袭、转移及预后之间的关系

张林, 孟龙, 王磊, 彭忠民, 杜贾军, 王晓航, 刘莹, 陈景寒

张林, 孟龙, 王磊, 彭忠民, 杜贾军, 王晓航, 陈景寒, 山东省立医院微创胸外科肺移植中心 山东省济南市 250021
刘莹, 山东省立医院病理科 山东省济南市 250021
张林, 男, 1970-09-13 生, 山东莘县人, 汉族. 1993 年青岛医学院本科毕业, 2003 年山东大学博士毕业, 2005 年天津医科大学博士后, 主治医师, 主要从事胸外肿瘤的临床基础工作.
通讯作者: 张林, 250021, 山东省济南市经五路 324 号, 山东省立医院微创胸外科肺移植中心. zhanglindocter@163.com.
电话: 0531-5186387 传真: 0531-7938911
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

Expression of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma and their association with invasion, metastasis and prognosis

Lin Zhang, Long Meng, Lei Wang, Zhong-Min Peng, Jia-Jun Du, Xiao-Hang Wang, Ying Liu, Jing-Han Chen

Lin Zhang, Long Meng, Lei Wang, Zhong-Min Peng, Jia-Jun Du, Xiao-Hang Wang, Jing-Han Chen, Center of Thoracic Minimal Invasive Surgery and Lung Transplantation, Shandong Provential Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Ying Liu, Department of Pathology, Shandong Provential Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China
Correspondence to: Dr. Lin Zhang, Center of Thoracic Minimal Invasive Surgery and Lung Transplantation, Shandong Provential Hospital, Jinan 250021, Shandong Province, China. zhanglindocter@163.com
Received: 2005-01-06 Accepted: 2005-02-26

Abstract

AIM: To detect the expression of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma, and to explore their association with invasion, metastasis and prognosis.

METHODS: A rapid immunohistochemical method (streptoavidin-peroxidase, SP) was used to detect CD44v6 and MMP-2 protein in 43 cases of esophagus squamous cell carcinoma-treated without radiotherapy or chemotherapy before operation.

RESULTS: The expression rates of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma were 62.7% (27/43) and 65.1% (28/43), respectively. The positive expression of MMP-2 and CD44v6 were significantly correlated with lymph node metastasis, TNM stage and postoperative hematogenous metastasis ($P < 0.05$). The 3-and 5-year survival rates of CD44v6 positive patients were 25.62%

and 6.41%. The 3-and 5-year survival rates of CD44v6 negative patients were 64.71% and 56.82%. There was significant difference for survival time between CD44v6 positive and CD44v6 negative patients ($P = 0.000$). The 3-and 5-year survival rates of MMP-2 positive patients were 18.8% and 8.60%. The 3-and 5-year survival rates of MMP-2 negative patients were 66.30% and 42.82%. There was significant difference between MMP-2 positive and MMP-2 negative groups ($P = 0.0067$). CD44v6 positive expression was significantly correlated with MMP-2 positive expression ($P = 0.007$).

CONCLUSION: CD44v6 and MMP-2 may play a role in esophagus squamous cell carcinoma invasion, lymph node metastasis, and postoperative hematogenous metastasis as well as the prognosis of the patients.

Key Words: CD44v6; MMP-2; Esophagus squamous cell carcinoma; Invasion; Metastasis

Zhang L, Meng L, Wang L, Peng ZM, Du JJ, Wang XH, Liu Y, Chen JH. Expression of CD44v6 and MMP-2 in esophagus squamous cell carcinoma and their association with invasion, metastasis and prognosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(9):1074-1077

摘要

目的: 探讨 CD44v6 和 MMP-2 在食管癌组织中的表达及其与食管癌侵袭转移和预后的关系。

方法: 回顾性分析 43 例术前未进行化疗和放疗的食管癌的切除标本, 采用免疫组化 S-P 法检测食管癌组织中的 CD44v6 和 MMP-2 的表达。

结果: 食管癌中 CD44v6 的阳性表达率 62.7%(27/43), MMP-2 的阳性表达率为 65.1%(28/43), CD44v6 及 MMP-2 的阳性表达与淋巴结的转移, 食管癌的病理分以及手术后血性转移显著相关 ($P < 0.05$), 而且, CD44v6 阳性表达者 3 a 生存率为 25.62%, 5 a 生存率为 6.41%, 阴性表达 3 a 生存率为 64.71%, 5 a 生存率为 56.82%, 二者之间差异显著 ($P = 0.000$); MMP-2 阳性者 3 a 生存率为 18.8%, 5 a 生存率为 8.67%, 阴性表达者 3 a 生存率为 66.30%, 5 a 生存率为 42.66%, 二者之间差异显著 ($P = 0.0067$); CD44v6 的阳性表达和 MMP-2 的阳性表达显著性相关 ($P = 0.007$)。

结论: CD44v6 和 MMP-2 对于食管鳞癌的侵袭、淋巴结转移、手术后血性转移以及预后有一定作用。

关键词: CD44v6; MMP-2; 食管鳞癌; 侵袭; 转移

张林, 孟龙, 王磊, 彭忠民, 杜贵军, 王晓航, 刘莹, 陈景寒. 食管鳞癌 MMP-2 和 CD44v6 表达与侵袭、转移及预后之间的关系. 世界华人消化杂志 2005; 13(9):1074-1077
http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1074.asp

0 引言

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)能够降解细胞外基质和基底膜成分, 破坏基底膜的完整性为肿瘤的浸润和转移提供了先决条件^[1-4]. 细胞黏附因子(cell adhesion moleculars, CAMs)参与细胞的信号传导与活化, 与肿瘤的生长分化尤其是与肿瘤的浸润转移密切相关. CD44v6 是细胞黏附因子的一种, 目前研究表明 CD44 与肿瘤的关系密切^[15-24]. 我们利用免疫组织化学方法检测食管鳞癌组织 MMP-2 和 CD44v6 的表达情况, 探讨这两种基因之间及其与食管鳞癌生物学行为, 特别是与食管癌浸润、转移、复发和预后之间的关系.

1 材料和方法

1.1 材料 我科 1996/1999 年手术切除的食管鳞癌标本 43 例, 所有病例术前未做任何形式的化疗和放疗, 男 25 例, 女 18 例, 年龄 35-72 岁(平均 55 岁), 按照国际标准进行分期 I (I A+ I B) 期 17 例, II (II A+ II B) 期 12 例, III (III A+ III B) 期 14 例. 淋巴结转移情况采用目前的国际分期, 在分期中, N0 代表淋巴结无转移, N1、N2 代表淋巴结转移, 只是转移的部位不同. 所有患者接受了食管癌切除胃食管吻合术和淋巴结清扫, 术后均严格随访, 无失访. 死亡 31 例, 存活 12 例, 5 a 生存率为 27.91%. 死亡的患者中有 21 例发生血性转移, 其中脑转移 3 例, 肝转移 8 例, 骨骼和脊柱转移 6 例, 肾上腺转移 1 例, 肺转移 3 例. 所有标本切取肿瘤标本蜡块. 鼠抗人 MMP-2mAb, 鼠抗人 CD44v6mAb,

即用型 S-P 试剂盒, DAB 二氨基联苯胺显色剂试剂盒, 以上试剂均购自福州迈新公司产品.

1.2 方法 采用 S-P 法. MMP-2 结果判定: MMP-2 阳性结果判定, 低倍镜下见细胞质内出现明确的棕黄色颗粒的细胞为阳性. 合并计算 5 个不同视野染色细胞百分数及染色强度, 作评分, 0 和 1 为阴性表达, 2 和 3 为阳性表达. CD44v6 结果判定 CD44v6 阳性产物分布于细胞膜上, 为粗细一致的棕黄色颗粒. 根据显色强度和阳性细胞数进行分级, 阴性(-)为整张组织切片均无着色; 弱阳性(+)为浅棕色, 阳性细胞计数 < 10%; 阳性(++)为棕色, 阳性细胞计数在 10-50%; 强阳性(+++)为深棕色, 阳性细胞计数 > 50%.

统计学处理 采用 χ^2 检验, 精确概率法和 Kaplan-meier 方法及 Log Rank 检验进行生存分析. Spearman 等级相关分析,

2 结果

2.1 MMP-2 的表达(图 1A) 鳞状细胞癌中阳性表达为 65.1%, 无淋巴结转移的患者中, MMP-2 的阳性率为 33.3%, 而 N1+N2 组的 MMP-2 的阳性率为 92.0%, 两组之间差异显著 ($\chi^2 = 16.404$, $P = 0.000$, 表 1). 说明 MMP-2 和淋巴结转移密切相关. I 期 17 例, 其中 MMP-2 阳性率为 41.2%, II 期 + III 期 26 例, 阳性率为 84.6%, 两组之间差异显著 ($\chi^2 = 8.833$, $P = 0.003$, 表 1). 说明食管癌临床分期越晚, MMP-2 的阳性表达越高. 转移组中, MMP-2 阳性表达率为 85.71%, 显著高于无转移复发组的 (50.0%) 差异显著 ($\chi^2 = 6.241$, $P = 0.012$, 表 1). MMP-2 阳性表达者 5 a 生存率为 6.4%, MMP-2 阴性者 5 a 生存率为 56.8%, 两组之间生存率之间经过 log-rank 检验, 具有显著性差异 ($P = 0.0067$, 图 2A).

2.2 CD44v6 的表达(图 1B) 淋巴结无转移者 CD44v6 阳性率为 33.3%, 而 N1+N2 组的 CD44v6 的阳性率为 84.0%, 两组之间差异显著 ($\chi^2 = 11.499$, $P = 0.001$, 表 1). I 期 17 例, CD44v6 阳性率为 35.3%, II 期 + III 食管

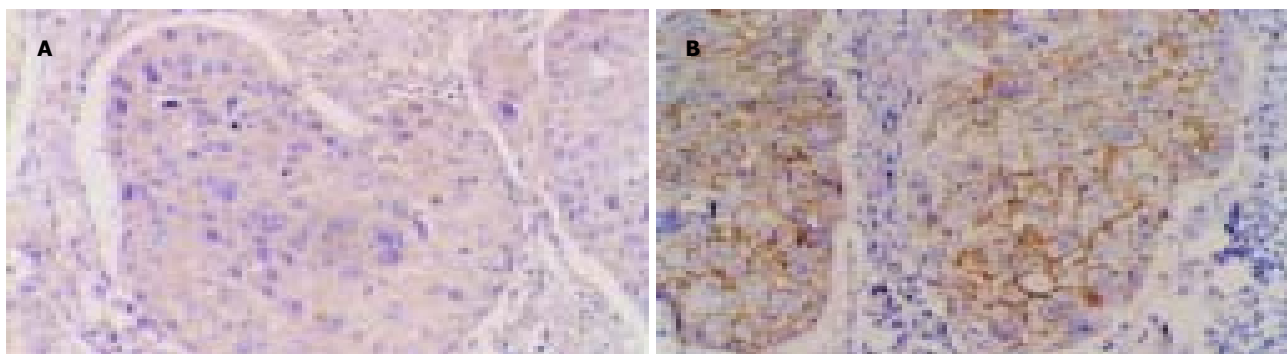


图 1 MMP-2 和 CD44v6 在食管鳞癌中的阳性表达(DBA, SP × 200). A: MMP-2; B: CD44v6.

癌 26 例，阳性率为 80.8%，两组之间差异显著 ($\chi^2 = 13.858, P = 0.000$, 表 1)。转移组 CD44v6 阳性表达率为 81.0% 显著高于无转移复发组 CD44v6 的阳性率 ($\chi^2 = 5.795, P = 0.016$, 表 1) CD44v6 阳性表达者 5 a 生存率为 10.7%，CD44v6 阴性者 5 a 生存率为 53.5%，二者差异显著 ($P = 0.000$, 图 2B)。

MMP-2 和 CD44v6 同时阳性的例数为 22 例，MMP-2 表达阳性组 CD44v6 阳性例数明显高于 MMP-2 表达阴性组 CD44v6 阳性例数 ($P < 0.05$)，经过 spearman 等级相关分析发现食管癌中 MMP-2 表达与 CD44v6 表达成正相关 ($r = 0.785, P < 0.01$, 表 2)，二者同时阳性患者生存期较差，3 a 生存期为 10.53%，5 a 生存率为 0% (图 2C)。

表1 食管癌组织 MMP-2 和 CD44v6 的表达情况

病理特点	MMP-2 阳性	CD44v6 阳性
N0	6(33.3)	6(33.3)
N1+N2	23(92.0) ^b	21(84.0) ^b
I	7(41.2)	5(28.4)
II + III	22(84.6) ^d	22(84.6) ^d
转移		
阳性(+)	18(85.7)	17(81.0)
阴性(-)	11(50.0) ^a	10(45.4) ^a
合计	28(65.1)	27(62.7)

^a $P < 0.05$ vs 阳性组; ^b $P < 0.01$ vs N0 组; ^d $P < 0.01$ vs I 期组。

表2 43例食管癌 MMP-2 表达与 CD44v6 表达阳性的关系

MMP-2 表达	n	CD44v6 表达阳性
阳性	28	22
阴性	15	5 ^b

^b $P < 0.01$ vs 阳性。

3 讨论

MMP-2 能够分解基底膜的主要成分—IV型胶原蛋白，而IV型胶原蛋白又是ECM的主要成分，故称为IV型胶原酶，MMP-2 (明胶酶 A/72 ku IV胶原酶)能够分解

基底膜的主要成分纤维连接蛋白和层连蛋白。本研究表明，MMP-2在食管癌组织中高表达这与其他研究报告相一致，本组食管鳞癌阳性率为 65.1%，MMP-2 与食管鳞癌的临床病例特征密切相关，淋巴结无转移的患者 MMP-2 阳性率为 33.3%，而淋巴结转移组的 MMP-2 的阳性率为 92.0% 二者之间有显著性差异。说明 MMP-2 和淋巴结转移密切相关，而且随着分期的升高，食管鳞癌组中 MMP-2 的阳性表达率明显增高，在 I 期中阳性率为 41.2%，II 期和 III 期中的阳性率为 84.6%，两组之间差异显著 ($P < 0.05$)。术后发生转移的 21 例中有 18 例为 MMP-2 阳性，无转移的 22 例患者中 11 例阳性，差异显著。MMP-2 能够促进肿瘤浸润转移所以影响了患者的预后，我们发现 MMP-2 阴性组的 3、5 a 生存率为 66.3% 和 42.8%，明显高于 MMP-2 阳性组。

细胞黏附因子 (cell adhesion molecules) 参与细胞的信号传导与活化，细胞的伸展和移动，细胞的生长和分化，肿瘤的转移等一系列重要的生理病理过程，CD44v6 为细胞黏附因子的一种，是当前研究的热点，我们发现 CD44v6 和淋巴结转移有密切关系。本组病例中，I 期和 II 期 + III 期相比较，阳性率分别为 35.3% 和 80.8%，两组之间差异显著 ($P < 0.05$)，也说明了 CD44v6 和食管鳞癌的分期相关。本研究证实，CD44v6 和血道转移相关，在术后发生血道转移者，CD44v6 的阳性表达为 81.0%。再次证实了 Griffioen *et al* 提出的 CD44 细胞黏附因子参与了血管形成的观点。本组患者中 CD44v6 阳性的 5 a 生存率为 6.4%，而 CD44v6 阴性的患者 5 a 生存率为 56.8%，经过 Log Rank 检验 P 值为 0.000 有显著性差别。说明 CD44v6 是影响患者预后的重要指标。

肿瘤的侵袭和转移包括一系列内在的联系步骤，是多分子参与的高度选择性的非随机过程。在这个复杂过程中，癌细胞之间，癌细胞与基质间，以及癌细胞与宿主细胞间的黏附至关重要。癌细胞转移有三步骤，即 (1) 癌细胞自身黏附性降低，脱离原发部位；(2) 降解，癌细胞和宿主细胞分泌多种蛋白酶，水解细胞外基质和基质膜中蛋白成分；(3) 移

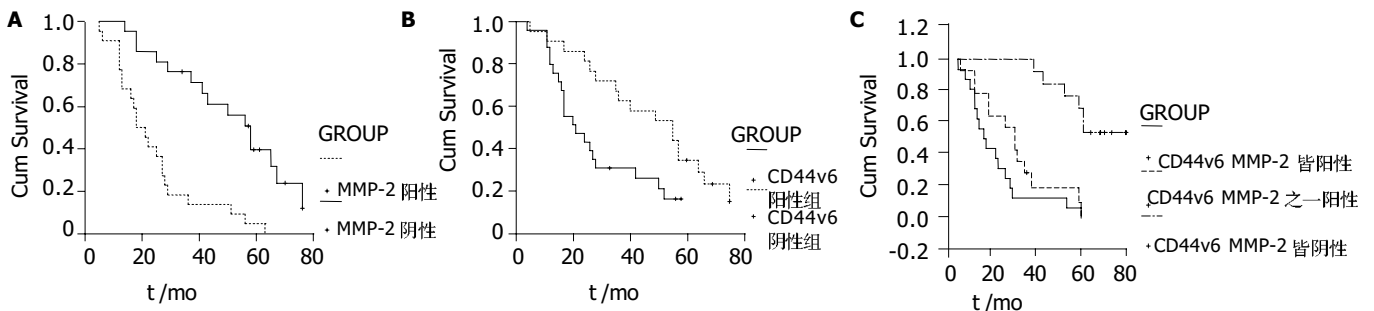


图2 食管鳞癌 MMP-2 和 CD44v6 的表达患者生存曲线。A: MMP-2; B: CD44v6; C: CD44v6, MMP-2 不同分组。

动, 最后癌细胞进入淋巴管或血管向远处转移, 黏附因子与癌转移过程密切相关; 血管生成是肿瘤生长转移等复杂过程中重要环节, 我们选择 CD44v6 及 MMP-2 因子观察其在食管鳞癌中的表达, 发现 CD44v6 和 MMP-2 在食管癌中的表达是正相关, 如表 2 所示 MMP-2 表达阳性组的 CD44v6 阳性例数明显高于 MMP-2 表达阴性组的 CD44v6 阳性例数, 经过 spearman 等级相关分析发现食管癌中 MMP-2 表达与 CD44v6 表达成正相关 ($r = 0.785 P < 0.05$) 我们在生存分析中发现, CD44v6 和 MMP-2 全部阴性的患者 3 a 生存率为 81.82%, 5 a 生存率为 72.73%, 其中一个阳性组的患者的 3 a 生存率 38.46%, 5 a 生存率为 28.85%, 全部阳性组的 3 a 生存率为 10.53%, 5 a 生存率为 0%, 三组之间进行检验有显著性差异 ($P = 0.001$). 表明联合检测 CD44V6 和 MMP-2 在食管鳞癌的表达可以帮助我们判断患者的病程发展及预后, Zhang *et al* 利用肺癌细胞株 QG90 研究证明 CD44S 能够调节 MMP-2 分泌. 对于二者在食管癌中的具体作用机制尚需进一步研究.

4 参考文献

- Ming SH, Sun TY, Xiao W, Xu XM. Matrix metalloproteinases-2, -9 and tissue inhibitor of metallo-proteinase-1 in lung cancer invasion and metastasis. *Chin Med J (Engl)* 2005;118:69-72
- Curran S, Dundas SR, Buxton J, Leeman MF, Ramsay R, Murray GI. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. *Clin Cancer Res* 2004;10:8229-8234
- Schnaeker EM, Ossig R, Ludwig T, Dreier R, Oberleithner H, Wilhelmi M, Schneider SW. Microtubule-dependent matrix metalloproteinase-2/matrix metalloproteinase-9 exocytosis: prerequisite in human melanoma cell invasion. *Cancer Res* 2004;64:8924-8931
- Naka T, Boltze C, Kuester D, Schulz TO, Samii A, Herold C, Ostertag H, Roessner A. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-1, MMP-2, MMP-9, cathepsin B, and urokinase plasminogen activator in non-skull base chordoma. *Am J Clin Pathol* 2004;122:926-930
- Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004;64:7622-7628
- Drew AF, Blick TJ, Lafleur MA, Tim EL, Robbie MJ, Rice GE, Quinn MA, Thompson EW. Correlation of tumor- and stromal-derived MT1-MMP expression with progression of human ovarian tumors in SCID mice. *Gynecol Oncol* 2004;95:437-448
- Pellikainen JM, Ropponen KM, Kataja VV, Kellokoski JK, Eskelinen MJ, Kosma VM. Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 in breast cancer with a special reference to activator protein-2, HER2, and prognosis. *Clin Cancer Res* 2004;10:7621-7628
- Lin TS, Chiou SH, Wang LS, Huang HH, Chiang SF, Shih AY, Chen YL, Chen CY, Hsu CP, Hsu NY, Chou MC, Kuo SJ, Chow KC. Expression spectra of matrix metalloproteinases in metastatic non-small cell lung cancer. *Oncol Rep* 2004;12:717-723
- Ishibashi Y, Matsumoto T, Niwa M, Suzuki Y, Omura N, Hanyu N, Nakada K, Yanaga K, Yamada K, Ohkawa K, Kawakami M, Urashima M. CD147 and matrix metalloproteinase-2 protein expression as significant prognostic factors in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 2004;101:1994-2000
- Sis B, Sagol O, Kupelioglu A, Sokmen S, Terzi C, Fuzun M, Ozer E, Bishop P. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-2, cathepsin D, and tenascin-C expression in colorectal carcinoma. *Pathol Res Pract* 2004;200:379-387
- Kerr KM, MacKenzie SJ, Ramasami S, Murray GI, Fyfe N, Chapman AD, Nicolson MC, King G. Expression of Fhit, cell adhesion molecules and matrix metalloproteinases in atypical adenomatous hyperplasia and pulmonary adenocarcinoma. *J Pathol* 2004;203:638-644
- Miyata Y, Kanda S, Nomata K, Hayashida Y, Kanetake H. Expression of metalloproteinase-2, metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in transitional cell carcinoma of upper urinary tract: correlation with tumor stage and survival. *Urology* 2004;63:602-608
- 蒋泽生, 方石岗, 高毅, 汪爽, 陈建锋. 二乙基亚硝酸铵诱发大鼠肝细胞癌发生过程中基质金属蛋白酶动态变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:759-762
- Leppa S, Saarto T, Vehmanen L, Blomqvist C, Elomaa I. A high serum matrix metalloproteinase-2 level is associated with an adverse prognosis in node-positive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:1057-1063
- Koyama S, Maruyama T, Adachi S. Expression of epidermal growth factor receptor and CD44 splicing variants sharing exons 6 and 9 on gastric and esophageal carcinomas: a two-color flow-cytometric analysis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999;125:47-54
- Bottger TC, Youssef V, Dutkowski P, Maschek H, Brenner W, Junginger T. Expression of CD44 variant proteins in adenocarcinoma of Barrett's esophagus and its relation to prognosis. *Cancer* 1998;83:1074-1080
- 李泽民, 樊剑芳, 方建萍. CD44v6 基因变异体在胃癌中的表达及其临床意义. *世界华人消化杂志* 2000;8(特刊8):21
- Roye GD, Myers RB, Brown D, Poczatek R, Beenken SW, Grizzle WE. CD44 expression in dysplastic epithelium and squamous-cell carcinoma of the esophagus. *Int J Cancer* 1996;69:254-258
- Faleiro-Rodrigues C, Lopes C. E-cadherin, CD44 and CD44v6 in squamous intraepithelial lesions and invasive carcinomas of the uterine cervix: an immunohistochemical study. *Pathobiology* 2004;71:329-336
- Bar JK, Grelewski P, Popiela A, Noga L, Rabczynski J. Type IV collagen and CD44v6 expression in benign, malignant primary and metastatic ovarian tumors: correlation with Ki-67 and p53 immunoreactivity. *Gynecol Oncol* 2004;95:23-31
- Vizoso FJ, Fernandez JC, Corte MD, Bongera M, Gava R, Allende MT, Garcia-Muniz JL, Garcia-Moran M. Expression and clinical significance of CD44V5 and CD44V6 in resectable colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:679-686
- Kawano T, Nakamura Y, Yanoma S, Kubota A, Furukawa M, Miyagi Y, Tsukuda M. Expression of E-cadherin, and CD44s and CD44v6 and its association with prognosis in head and neck cancer. *Auris Nasus Larynx* 2004;31:35-41
- Rodrigo JP, Dominguez F, Alvarez C, Herrero A, Suarez C. Expression of E-cadherin, CD44s, and CD44v6 in laryngeal and pharyngeal carcinomas. *Am J Otolaryngol* 2003;24:384-389
- Li Y, Zhang JH, Kuang G, Yang JQ, Zhao Q, Wang XL, Jiao ZK, Zhang ZD, Wang LL. Expression of MUC1, CD44v6, nm23 in gastric carcinomas and regional lymph node tissues and their association with invasion, metastasis, and prognosis of the tumor. *Ai Zheng* 2003;22:985-989