

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2013.03.008

RKIP、MMP-2 与非小细胞肺癌侵袭转移的关系

杨大运¹, 齐 战²

Study on Expression of RKIP and MMP-2 in NSCLC Invasion and Metastasis

Yang Dayun¹, Qi Zhan²

1. Department of Internal Medicine, The Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China, 2. Department of Thoracic Surgery

Abstract: Objective To investigate the expression of raf kinase inhibitor protein (RKIP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in non-small cell lung cancer (NSCLC) and their correlation with the clinicopathologic features and prognosis. **Methods** RKIP and MMP-2 protein expression of 83 cases of lung carcinoma specimens and non-tumor lung samples around were investigated by using immunohistochemistry.

Results Immunohistochemistry results revealed that of the 83 cases, there was a low expression between RKIP and a high expression of MMP-2, 20.5% (17/83) and 69.9% (58/83) respectively. There was correlation between RKIP and MMP-2 protein expression and differentiation of tumor, TNM staging, development of lymph node metastasis and the survival time ($P < 0.05$, respectively). RKIP expression was negatively correlated with MMP-2 expression in NSCLC ($P < 0.05$); the 2-year survival rate with low level of RKIP protein was much more decreased than those with high level of MMP-2 protein ($P < 0.05$).

Conclusion The low expression of RKIP was closely correlated with invasion and metastasis of NSCLC. RKIP may be a NSCLC metastasis suppressor, whose down-regulation expression would lead to the over-expression of MMP-2, as a result, promoting the invasion and metastasis of lung carcinoma cells.

Key words: Non-small cell lung cancer; Raf kinase inhibitor protein; Matrix metalloproteinase-2; Immunohistochemistry

摘要:目的 检测非小细胞肺癌组织中 Raf 激酶抑制蛋白 (raf kinase inhibitor protein, RKIP) 和基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 的表达及其与临床病理特征及预后的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法 (SP 法) 检测 83 例非小细胞肺癌及其癌旁正常肺组织中 RKIP 与 MMP-2 蛋白的表达情况。**结果** 83 例非小细胞肺癌中, RKIP 及 MMP-2 蛋白的表达率分别为 20.5% (17/83) 和 69.9% (58/83), 其表达水平与非小细胞肺癌的分化程度、TNM 分期、淋巴结或远处转移及术后生存时间有明显关系; RKIP 蛋白的表达水平与 MMP-2 呈负相关 ($P < 0.05$); RKIP 蛋白低表达与 MMP-2 蛋白高表达的病例 2 年生存率明显降低 ($P < 0.05$)。**结论** RKIP 低表达与非小细胞肺癌的侵袭、转移密切相关, RKIP 可能是非小细胞肺癌的一个转移抑制蛋白, RKIP 表达下调导致 MMP-2 的过表达从而促进非小细胞肺癌细胞的侵袭和转移。

关键词: 非小细胞肺癌; Raf 激酶抑制蛋白; 基质金属蛋白酶-2; 免疫组织化学法

中图分类号: R734.2 **文献标识码:** A

0 引言

非小细胞肺癌是最常见的恶性肿瘤之一, 其侵袭转移和复发是患者死亡的主要原因, 肿瘤细胞与细胞外基质、基膜的相互作用是浸润转移的关键步骤, 由肿瘤细胞和周围间质合成和分泌的基质金属

蛋白酶-2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2), 是降解正常细胞和肿瘤细胞的结构支持网络的蛋白水解酶, 通过降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和多种胶原蛋白, 在肿瘤血管生成及促进肿瘤细胞的侵袭转移中发挥作用^[1]。Raf 激酶抑制蛋白 (Raf kinase inhibitor protein, RKIP) 属于高度保守的磷脂酰乙醇胺结合蛋白 (phosphatidylethanolamine binding protein, PEBP) 家族, 广泛存在于多种生物中。RKIP 参与 MAPK/ERK、G 蛋白、NF- κ B 等多条信号通路的调节, 具有抑制肿瘤细胞转移的作用, 被认为是肿瘤转移抑制基因。本研究采用

收稿日期: 2012-04-13; 修回日期: 2012-08-15

基金项目: 河北省科技计划项目资助课题 (12277723)

作者单位: 1. 050011 石家庄, 河北医科大学第四医院感染内科, 2. 胸外科

作者简介: 杨大运 (1973-), 女, 硕士, 副主任医师, 主要从事肺癌侵袭与转移的研究

免疫组织化学方法检测 RKIP 和 MMP-2 在非小细胞肺癌及正常肺组织中的表达,探讨 RKIP 和 MMP-2 的表达及其临床意义。

1 资料和方法

1.1 资料

1.1.1 研究对象 收集河北医科大学肿瘤医院 2007—2008 年间确诊为非小细胞肺癌手术切除标本 83 例,每例标本取癌组织及其邻近的正常组织,其中男 48 例,女 35 例。年龄 33~75 岁,平均 53.7 岁。全部病例术前未接受过放疗或化疗。按照 AJCC 和 UICC 分期委员会 1997 年公布修订的分期标准分为:鳞癌 36 例,腺癌 47 例;高分化 25 例,中分化 23 例,低分化 35 例;I + II 期 38 例,III + IV 期 45 例;根据有无淋巴结转移分为淋巴结转移阳性组 43 例,阴性组 40 例。所有病例均经病理证实,均有完整随访资料,随访截止日期为 2010 年 12 月,生存期的计算从手术日期到随访截止日期,或由于复发、转移而死亡的日期为止。

1.1.2 主要试剂 即用型兔抗人 RKIP 多克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司;MMP-2 单克隆抗体购自福州迈新公司;免疫组织化学 SP 试剂盒和 DAB 显色试剂盒均购自北京中山公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色 对石蜡切片进行免疫组织化学链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin peroxidase,SP)法测定。免疫组织化学染色程序按试剂盒说明书进行,主要包括石蜡切片、常规脱蜡至水,抗原修复、3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化物酶、山羊血清封闭、滴加一抗、二抗及链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物、DAB 显色、对比染色封片。用已知 RKIP、MMP-2 阳性的肺癌切片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 结果判定 RKIP 和 MMP-2 蛋白表达强度根据阳性物质的着色深浅及面积判断。评分标准按 Shimizu 方法,对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、着淡黄色、棕黄色和棕褐色分别计 0、1、2、3 分;着色阳性面积按无着色、着色 < 1/3、1/3~2/3、> 2/3 分别计 0、1、2、3 分;然后根据两项计分之和判断其结果:≥ 3 分为阳性。

1.2.3 随访情况 通过电话、信件及入户调查等随访方式,随访 83 例非小细胞肺癌患者从手术之日起两年内是否生存、生存时间及其死亡原因。

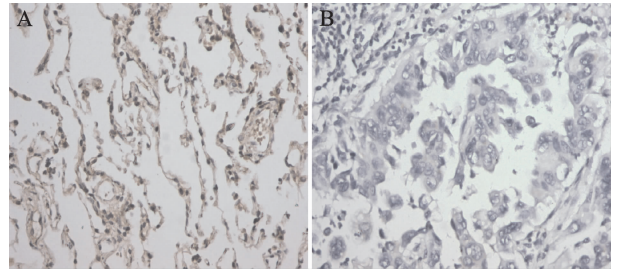
1.3 统计学方法

应用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,组间比较采用 χ^2 检验,相关分析采用 Spearman 等级相关分析法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同肺组织 RKIP 的免疫组织化学染色结果

RKIP 阳性着色主要分布于细胞质,高倍镜下呈棕黄色颗粒,多呈弱阳性和阴性,见图 1A、1B。RKIP 在非小细胞肺癌组织中的表达水平为 20.5% (17/83),低于正常肺组织 79.5% (66/83),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。



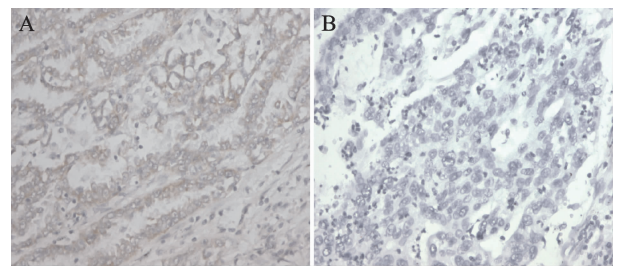
A: positive staining of RKIP in normal lung tissue; B: negative staining of RKIP in non-small cell lung cancer tissue

图 1 RKIP 在不同肺组织中的表达(IHC × 200)

Figure 1 Expression of RKIP in different lung tissues(IHC × 200)

2.2 不同肺组织 MMP-2 的免疫组织化学染色结果

MMP-2 阳性着色主要分布于肿瘤细胞的胞质和(或)胞核中,高倍镜下呈棕黄色颗粒,多呈中度和强阳性,见图 2A、2B;MMP-2 在非小细胞肺癌组织中的表达水平为 69.9% (58/83) 高于正常肺组织 30.1% (25/83),差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 1。



A: positive staining of MMP-2 in non-small cell lung cancer tissue; B: negative staining of MMP-2 in normal lung tissue

图 2 MMP-2 在不同肺组织中的表达(IHC × 200)

Figure 2 Expression of MMP-2 in different lung cancer tissues(IHC × 200)

2.3 RKIP 与 MMP-2 蛋白表达与临床病理特征的关系

在 83 例非小细胞肺癌中,RKIP 与 MMP-2 蛋白的阳性表达均与肿瘤瘤体大小、性别以及大量吸烟史无关($P > 0.05$),而与肿瘤的分化程度、TNM 分期、术后生存期、淋巴结转移相关($P < 0.05$),见表 2。

表 1 非小细胞肺癌、正常肺组织中 RKIP 与 MMP-2 蛋白表达结果[例(%)]

Table 1 Comparison of RKIP and MMP-2 expression between non-small cell lung cancer and paracancerous normal lung tissues[n(%)]

Groups	n	RKIP positive(%)	χ^2	P	MMP-2 positive(%)	χ^2	P
Paracancerous tissues	83	66(79.5)			25(30.1)		
Cancer tissues	83	17(20.5)	57.855	0.000	58(69.9)	26.241	0.000

表 2 非小细胞肺癌组织中 RKIP 和 MMP-2 阳性表达与临床病理特征的关系[例(%)]

Table 2 The relationship between positive expression of RKIP and MMP-2 with clinicopathologic characteristics of non-small cell lung cancer[n(%)]

Variable	n	RKIP positive	χ^2	P	MMP-2 positive	χ^2	P
Gender							
Male	48	9(18.8)			32(66.7)		
Female	35	8(22.9)	0.210	0.647	26(74.3)	0.210	0.647
Smoking							
Yes	43	10(23.3)			30(69.8)		
No	40	7(17.5)	0.422	0.516	28(70.0)	0.001	0.982
Age(years)							
≤50	43	11(25.6)			27(62.8)		
>50	40	6(15.0)	1.425	0.233	31(77.5)	2.130	0.144
Diameter(cm)							
≤3	42	9(21.4)			26(61.9)		
>3	41	8(19.5)	0.047	0.829	32(78.0)	2.569	0.109
Histological type							
Squamous cell carcinoma	36	8(22.2)			25(69.4)		
Adenocarcinoma	47	9(19.1)	0.118	0.731	33(70.2)	0.006	0.940
Differentiation							
Well	25	9(36.0)			12(48.0)		
Mediate	23	5(21.7)	6.767	0.034	16(69.6)	9.856	0.007
Poor	35	3(8.6)			30(85.7)		
pTNM stage							
I ~ II	38	13(34.2)			22(57.9)		
III ~ IV	45	4(8.9)	8.111	0.004	36(80.0)	4.783	0.029
Survival time(years)							
≥2	39	12(30.8)			21(53.8)		
<2	44	5(11.4)	4.780	0.029	37(84.1)	8.985	0.003
Lymph node metastasis							
No	40	12(30.0)			22(55.0)		
Yes	43	5(11.6)	4.295	0.038	36(83.7)	8.121	0.004

2.4 RKIP 与 MMP-2 蛋白表达的关系

在 83 例非小细胞肺癌标本中, RKIP 和 MMP-2 同时表达阳性的有 7 例, 同时表达阴性的有 15 例, RKIP 表达阳性而 MMP-2 表达阴性的有 10 例, RKIP 表达阴性而 MMP-2 表达阳性的有 51 例。Spearman 等级相关分析显示, 两者在非小细胞肺癌组织中表达呈显著负相关 ($r = -0.318, P = 0.003$), 见表 3。

表 3 非小细胞肺癌中 RKIP 与 MMP-2 表达的相关性

Table 3 The relationship of RKIP and MMP-2 expression in non-small cell lung cancer

MMP-2	RKIP		r	P
	Positive	Negative		
Positive	7	51		
Negative	10	15	-0.318	0.003
Sum	17	66		

3 讨论

RKIP 是 PEBP 家族成员之一,参与对 ERK/MAPK、G 蛋白偶联受体和 NF- κ B 信号通路的调控。这些信号通路的异常激活还与多种肿瘤的发生发展密切相关,研究发现,RKIP 在肝癌^[1]、黑色素瘤^[2]、结直肠癌^[3]、前列腺癌^[4]、乳腺癌^[5]等多种肿瘤中表达下调或缺失,且与肿瘤的转移及预后较差有关,被认为是一种新的肿瘤转移抑制基因。本研究结果显示,RKIP 在非小细胞肺癌中的阳性表达率显著低于癌旁正常肺组织;RKIP 的阳性表达与 TNM 分期有关,随着分期的增加而降低,分期越晚,表达量越低;RKIP 的阳性表达与非小细胞肺癌的分化程度有关,分化程度越低,阳性表达越低;RKIP 的阳性表达水平随着肺癌淋巴结转移的发展而呈现下调的趋势,并且 RKIP 低表达者生存期短,说明 RKIP 参与了肺癌的发生及浸润转移过程。

金属基质蛋白酶(MMPs)是一类由结缔组织细胞分泌、参与细胞外基质降解、Zn²⁺ 依赖性的内源性蛋白水解酶,属于锌肽酶超家族。MMP-2 又称为明胶酶 A,是 MMPs 家族中的重要成员之一,通过降解基底膜的主要成分 IV 型胶原,在肿瘤的浸润性生长、淋巴结转移和血管生成中起着至关重要的作用。研究表明 MMP-2 在乳腺癌^[6]、肺癌^[7]、头颈鳞癌^[8]等多种肿瘤中均显著增高,并与肿瘤分化和病理分级相关。本研究结果显示,MMP-2 在非小细胞肺癌中的阳性表达率显著高于癌旁正常肺组织,表明在非小细胞肺癌的发生过程中,MMP-2 表达上调是一个关键事件^[7]。本研究表明 MMP-2 的阳性表达与 TNM 分期有关,分期越晚,表达量越高;MMP-2 的阳性表达与非小细胞肺癌的分化程度有关,分化程度越低,表达量越高;MMP-2 阳性表达水平随着肺癌淋巴结转移而呈现上调的趋势,并且 MMP-2 高表达者生存期短,与报道结果一致^[9]。

Beshir 等^[10] 研究发现,RKIP 参与细胞内 MAPK/ERK 及 NF- κ B 等信号转导途径的调节,是通过控制 MMP-1/2 的表达,从而发挥其促进肿瘤细胞浸润转移的功能;过表达 RKIP 后肿瘤细胞的浸润转移能力减弱,MMP-1/2 表达水平降低,而沉默 RKIP 后肿瘤细胞的浸润转移能力增强,MMP-1/2 表达水平增高。本研究发现,RKIP 在非小细胞肺癌组织中阳性表达减弱或缺失,MMP-2 的阳性表达增加,造成了 MMP-2 蛋白过剩,从而促进了肺癌细胞的浸润转移。

综上所述,肿瘤侵袭转移的机制十分复杂,研究 RKIP 及 MMP-2 与肿瘤侵袭转移的关系和相关调控机制,可为我们认识肿瘤进程的机制提供有力的依据,为临床肿瘤的诊断预防提供可靠的指标,也为临床治疗肿瘤提供新的策略和方向。因此,对 RKIP 及 MMP-2 表达的检测可作为评估患者淋巴结转移及预后的因素之一,RKIP 可作为人类非小细胞肺癌的转移抑制基因,成为治疗肺癌侵袭转移的新靶点。

参考文献:

- [1] Xu YF, Yi Y, Qiu SJ, et al. PEBP1 downregulation is associated to poor prognosis in HCC related to hepatitis B infection[J]. J Hepatol, 2010, 53(5): 872-9.
- [2] Lin K, Baritaki S, Militello L, et al. The role of B-RAF mutations in melanoma and the induction of EMT via dysregulation of the NF-kappaB/Snail/RKIP/PTEN circuit[J]. Genes Cancer, 2010, 1(5): 409-20.
- [3] Minoo P, Zlobec I, Baker K, et al. Loss of raf-1 kinase inhibitor protein expression is associated with tumor progression and metastasis in colorectal cancer [J]. Am J Clin Pathol, 2007, 127(5): 820-7.
- [4] Fu Z, Kitagawa Y, Shen R, et al. Metastasis suppressor gene Raf kinase inhibitor protein (RKIP) is a novel prognostic marker in prostate cancer[J]. Prostate, 2006, 66(3): 248-56.
- [5] Li HZ, Gao Y, Zhao XL, et al. Effects of raf kinase inhibitor protein expression on metastasis and progression of human breast cancer[J]. Mol Cancer Res, 2009, 7(6): 832-40.
- [6] Daniele A, Zito AF, Giannelli G, et al. Expression of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in sentinel lymphnode and serum of patients with metastatic and non - metastatic breast cancer [J]. Anticancer Res, 2010, 30(9): 3521-7.
- [7] Chetty C, Lakka SS, Bhoopathi P, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 suppresses tumor angiogenesis in matrix metalloproteinase 2-down-regulated lung cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(12): 4736-45.
- [8] Canel M, Secades P, Garzón-Arango M, et al. Involvement of focal adhesion kinase in cellular invasion of head and neck squamous cell carcinom as via regulation of MMP-2 expression[J]. Br J Cancer, 2008, 98 (7): 1274-84.
- [9] Nishida Y, Miyamori H, Thompson EW, et al. Activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) by membrane type 1 matrix metalloproteinase through an artificial receptor for proMMP-2 generates active MMP-2 [J]. Cancer Res, 2008, 68(21): 9096-104.
- [10] Beshir AB, Ren G, Magpusao AN, et al. Raf kinase inhibitor protein suppresses nuclear factor-kappaB-dependent cancer cell invasion through negative regulation of matrix metalloproteinase expression[J]. Cancer Lett, 2010, 299(2): 137-49.

[编辑:黄国玲;校对:周永红]