

## 基质金属蛋白酶-9 在胃癌中的表达及其预后价值\*

541001 广西桂林 桂林医学院附属医院消化科

李晓珊, 徐庆<sup>1</sup>, 傅向阳, 罗伟生<sup>2</sup>

**【摘要】** 目的 探讨基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在胃癌组织中的表达情况,分析其表达与胃癌临床病理特征及预后的关系。方法 采用免疫组化法检测 101 例胃癌及其癌旁组织中 MMP-9 的表达情况,并分析胃癌 MMP-9 表达与临床病理特征的关系。采用 Kaplan-Meier 法进行生存随访分析,用 Cox 回归模型分析影响生存预后的独立因素。结果 胃癌组织的 MMP-9 高表达率为 54.5%,高于癌旁组织的 15.5% ( $P<0.001$ )。胃癌组织中 MMP-9 表达与肿瘤直径、位置、浸润深度、淋巴结转移和临床分期有关 ( $P<0.05$ )。全组胃癌患者的中位无复发生存期(RFS)和总生存期(OS)分别为 28.0 个月和 35.0 个月。MMP-9 低表达者的中位 RFS 和 OS 分别为 63.0 个月和 65.0 个月, MMP-9 高表达者分别为 11.0 个月和 17.0 个月,差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ )。多因素 Cox 回归分析显示,肿瘤直径、淋巴结转移和 MMP-9 蛋白表达状态是胃癌患者 RFS 和 OS 的独立预后因素。结论 MMP-9 表达水平与胃癌侵袭转移和预后相关, MMP-9 可作为判断胃癌患者预后的有效分子标志物。

**【关键词】** 基质金属蛋白酶-9; 胃癌; 侵袭; 转移; 预后

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1009-0460(2014)09-0804-05

### Expression of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer and its prognostic significance

LI Xiaoshan, XU Qing, FU Xiangyang, LUO Weisheng. Department of Gastroenterology, Affiliated Hospital of Guilin Medical University, Guilin 541001, China

Corresponding author: LUO Weisheng, E-mail: wsluo58@aliyun.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-9(MMP-9) in gastric cancer and evaluate its relationship with clinicopathological characteristics and prognosis of gastric cancer. **Methods** The expression of MMP-9 in 101 gastric cancer patients was determined by immunohistochemistry. The relationship between MMP-9 with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer was analyzed. The patients were followed up and recurrence-free survival (RFS) and overall survival (OS) were estimated using the Kaplan-Meier method, while factors influencing prognosis were tested by Cox proportional hazard model. **Results** Overexpression rate of MMP-9 was 54.5% of gastric cancer samples, higher than 15.5% of adjacent normal tissue ( $P<0.001$ ). The expression of MMP-9 was closely related to tumor size, tumor site, tumor invasion, lymph node metastasis and clinical stage in gastric cancer samples ( $P<0.05$ ). The median RFS and OS of 101 patients were 28.0 and 35.0 months, respectively. Moreover, the patients with MMP-9 lower expression had better RFS and OS than those with MMP-9 overexpression (63.0 vs. 11.0 months, 65.0 vs. 17.0 months;  $P<0.001$ ). The multivariate Cox proportional hazard regression analysis of prognostic factors for RFS and OS showed that the expression of MMP-9, tumor size, lymphnode metastasis were independent factors for prognosis of gastric cancer. **Conclusion** The expression of MMP-9 is correlated with tumor invasion and metastasis, and it can be a powerful molecular marker to predict the prognosis of gastric cancer.

**【Key Words】** Matrix metalloproteinase-9(MMP-9); Gastric cancer; Invasion; Metastasis; Prognosis

胃癌是消化道常见的恶性肿瘤,其发病率呈上升趋势<sup>[1]</sup>。肿瘤侵袭转移是导致胃癌进展以及影响预后的主要原因。基质金属蛋白酶-9(matrix met-

alloproteinase-9, MMP-9)是基质金属蛋白酶家族中的重要成员,主要由巨噬细胞、结缔组织细胞和某些肿瘤细胞合成分泌。目前认为其主要功能是分

\* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81360530)

1 510004 桂林医学院基础医学院

2 通讯作者, E-mail: wsluo58@aliyun.com

解基底膜成分、明胶及 IV 型胶原蛋白,其过度表达与肿瘤侵袭转移密切相关<sup>[2]</sup>。有研究报道 MMP-9 蛋白表达与胃癌侵袭转移密切相关<sup>[3-4]</sup>,但其在胃癌预后中的作用尚未见报道。本研究通过免疫组织化学法检测胃癌组织中 MMP-9 蛋白的表达情况,并探讨 MMP-9 在胃癌预后中的预测价值。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2005 年 1 月至 2007 年 5 月在桂林医学院附属医院接受标准 D<sub>2</sub> 手术切除的胃癌患者 101 例。其中男性 59 例,女性 42 例;年龄 22~82 岁,中位年龄 58 岁;病理类型:腺癌 76 例,黏液腺癌 8 例,印戒细胞癌 17 例。所有患者均有完整的病历资料,符合以下入组标准:经病理组织学确诊为胃癌;影像学检查排除远处转移及其他肿瘤;术前均未接受任何抗肿瘤治疗。入组患者为连续性选择病例。临床病理分期采用 2010 年 UICC/AJCC 第 7 版 TNM 分期法<sup>[5]</sup>,其中 I 期 25 例,II 期 14 例,III 期 23 例,IV 期 39 例。以 101 例胃癌组织的配对癌旁组织作为对照。

**1.2 免疫组织化学染色及结果判断** 组织标本均经 10% 甲醛固定,常规脱水、包埋,连续 5 $\mu$ m 切片。组织切片脱蜡后浸泡于梯度乙醇水化;3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育,以阻断内源性过氧化物酶;微波抗原修复;滴加非免疫性山羊血清,室温封闭 30min;滴加兔抗人 MMP-9 抗体(稀释 1:200, ab38898, 购自 Abcam 公司),4 $^{\circ}$ C 过夜, PBS 冲洗;滴加 En Vision 二抗(GK500710, 购自 Gene Tech 公司),37 $^{\circ}$ C 孵育 30min, PBS 冲洗;DAB 显色,苏木素复染;二甲苯透明,中性树脂封片。以已知强阳性染色的组织切片作为阳性对照,0.01mol/L PBS 代替一抗作为阴性

对照。

参照文献[6]制定本实验染色判断标准:细胞质染色为淡黄至棕黄色者为阳性细胞。每张切片随机选择 5 个视野,每个视野计数 100 个细胞,根据阳性肿瘤细胞数的比例分为:阳性细胞<5%计为 0 分,5%~20%计 1 分,21%~50%计 2 分,>50%计 3 分。按评分高低分级:0~1 分设为低表达,2 分及以上为高表达。以上结果由两位病理医师独立阅片并记录。

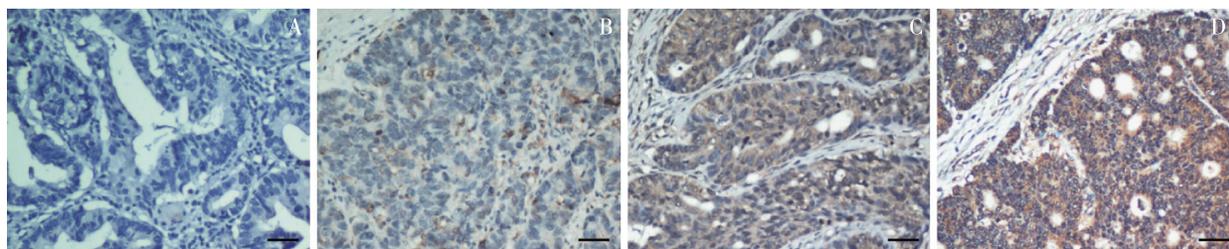
**1.3 随访** 随访截止于 2013 年 9 月 30 日,中位随访时间为 35.0 个月(5~82 个月),无失访病例。术后定期随访,主要采用病历跟踪、电话及信件随访的方式。综合临床体征、影像学检查(B 超、CT 或 MRI 等)以及肿瘤标记物结果,提示局部或远处器官出现新病灶,即诊断为肿瘤复发。总生存期(OS)定义为手术之日至患者死亡或随访截止的时间。无复发生存期(RFS)定义为手术之日至诊断肿瘤复发或患者死亡的时间。

**1.4 统计学分析** 采用 SPSS 16.0 软件进行统计学处理。计量资料采用  $\chi^2$  检验,生存分析用 Kaplan-Meier 法和 Log-rank 检验,多因素分析用 Cox 比例风险模型。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 MMP-9 在胃癌及其癌旁组织中的表达情况

MMP-9 在胃癌组织中的表达主要定位于细胞浆,间质细胞有少量表达,呈不同染色程度的棕黄色颗粒。胃癌组织的 MMP-9 高表达率为 54.5% (55/101),在可评估的 84 例癌旁组织中为 15.5% (13/84),两组差异有统计学意义( $P<0.001$ )。见图 1。



A:0分;B:1分;C:2分;D:3分

图 1 MMP-9 在胃癌组织中的染色评分(En Vision  $\times 200$ )

**2.2 MMP-9 表达与胃癌临床病理特征的关系** 胃癌组织 MMP-9 表达与肿瘤直径、位置、浸润深度、淋

巴结转移及临床分期有关( $P < 0.05$ ),而与性别、年龄以及分化程度无关( $P > 0.05$ )。见表 1。

表 1 胃癌组织 MMP-9 表达与临床病理特征的关系[例(%)]

临床病理参数	n	MMP-9		P
		低表达	高表达	
性别				0.724
男	59	26(44.1)	33(55.9)	
女	42	20(47.6)	22(52.4)	
年龄(岁)				0.199
≤60	66	27(40.9)	39(59.1)	
>60	35	19(54.3)	16(45.7)	
肿瘤大小(cm)				0.024
≤5	65	35(53.8)	30(46.2)	
>5	36	11(30.6)	25(69.4)	
肿瘤位置				0.029
近端 1/3	21	14(66.7)	7(33.3)	
远端 2/3	80	32(40.0)	48(60.0)	
分化程度				0.951
高、中	37	17(45.9)	20(54.1)	
低、未	64	29(45.3)	35(54.7)	
浸润深度				0.001
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	46	31(67.4)	15(32.6)	
T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	55	15(27.3)	40(72.7)	
淋巴结转移				<0.001
无	30	24(80.0)	6(20.0)	
有	71	22(31.0)	49(69.0)	
临床分期				<0.001
I/II	39	28(71.8)	11(28.2)	
III/IV	62	18(29.0)	44(71.0)	

2.3 MMP-9 表达与胃癌预后的关系 单因素分析显示,肿瘤直径、位置、浸润深度、MMP-9 及淋巴结转移影响胃癌患者的 RFS 和 OS。全组患者的中位 RFS 和 OS 分别为 28.0 个月和 35.0 个月,而 1、3、5 年生存率分别为 79.2%、54.5% 和 42.4%。MMP-9 低表达者的中位 RFS 和 OS 分别为 63.0 个月和 65.0 个月,而 MMP-9 高表达者分别为 11.0 个月和 17.0 个月;MMP-9 低表达者的 1、3、5 年生存率分别为 97.8%、84.7% 和 73.2%,而 MMP-9 高表达者分别为 63.6%、27.8% 和 15.0%。见表 2、图 2。

2.4 影响胃癌预后的多因素分析 Cox 比例风险回归模型显示,肿瘤直径、淋巴结转移和 MMP-9 表达是影响胃癌 RFS 和 OS 的独立预后因素。见表 3。

### 3 讨论

胃癌细胞的侵袭与转移是影响胃癌患者预后的最根本原因。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的降解在恶性肿瘤的侵袭转移过程中起到重要的作用,是肿瘤侵袭转移的重要信号和途径。MMPs 作为一种内肽酶,是降解细胞外基质的主要物质<sup>[7]</sup>。体外实验已证实 MMPs 参与肿瘤的侵袭转移,在无转移潜能或低转移潜能的细胞中诱导 MMPs 的表达,可提高细胞侵袭转移的能力;而下调高侵袭转移潜能的细胞中 MMPs 的表达,则可使细胞丧失侵袭转移的表型<sup>[8]</sup>。目前,已发现的 MMPs 已达 19 种,按照其作用底物的不同可归为五大类:(1)胶原酶类;(2)明胶酶类;(3)基质降解素类;(4)膜型基质金属蛋白酶类;(5)其他酶类<sup>[9]</sup>。其中 MMP-2 和 MMP-9 属于明胶酶类,是降解 ECM 最主要的物质,它们参与基底膜和 ECM 内的 IV 型胶原的降解。MMP-9 定位于染色体 20q12~q13 上,基因全长为 4506bp,含有 13 个外显子;在组织重建和损伤愈合中发挥重要的作用,而其活性异常,在肿瘤浸润及转移中起着重要的作用<sup>[10]</sup>。

已有研究报道,MMP-9 蛋白在肿瘤组织中表达增加,并与肿瘤侵袭转移密切相关。Reis 等<sup>[11]</sup>采用实时定量 PCR 技术检测 40 例膀胱癌组织和 5 例正常膀胱组织中 MMP-9 蛋白的表达情况,结果显示 MMP-9 蛋白在膀胱癌组织中的表达明显较其正常组织增加。李冬霞等<sup>[12]</sup>采用免疫组化法检测 52 例胃癌组织和 30 例正常胃黏膜组织中 MMP-9 蛋白的表达情况,结果发现 MMP-9 蛋白的异常表达可能在胃癌的发生、发展及浸润转移过程中发挥重要作用。本研究通过检测 101 例胃癌组织和 84 例癌旁组织中 MMP-9 的表达,并分析其与临床病理特征的关系发现,MMP-9 蛋白在胃癌组织中的表达明显高于其在癌旁组织中的表达,且 MMP-9 表达与胃癌的肿瘤直径、肿瘤位置、肿瘤浸润深度、淋巴结转移和临床分期相关;进一步分析发现,MMP-9 在肿瘤侵犯(或穿透)浆膜层(T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub>)或有淋巴结转移的胃癌组织中表达增加;此外,Zhao 等<sup>[13]</sup>发现抑制 SGC7901 胃癌细胞中 MMP-9 蛋白的表达能够抑制胃癌细胞的生长以及下调肿瘤细胞的侵袭能力。以上结果提示胃癌中 MMP-9 的表达情况可能与肿瘤侵袭转移密切相关。

表 2 影响胃癌患者预后的单因素分析

临床病理参数	n	无复发生存率(%)			生存率(%)		
		3 年	5 年	P	3 年	5 年	P
性别				0.186			0.409
男	59	47.7	44.0		54.8	43.7	
女	42	44.3	30.4		53.9	40.4	
年龄(岁)				0.485			0.471
≤60	66	45.7	37.2		50.4	40.3	
>60	35	47.3	41.0		62.1	46.6	
肿瘤大小(cm)				0.006			0.005
≤5.0	65	55.8	46.9		60.5	50.0	
>5.0	36	29.0	23.2		43.5	29.0	
肿瘤位置				0.054			0.030
近端 1/3	21	65.3	59.9		75.4	64.6	
远端 2/3	80	41.3	33.0		49.0	36.7	
分化程度				0.731			0.354
高、中	37	40.5	37.4		45.8	40.1	
低、未	64	49.7	39.0		59.6	43.8	
浸润深度				<0.001			<0.001
T <sub>1</sub> /T <sub>2</sub>	46	68.5	63.3		68.4	63.2	
T <sub>3</sub> /T <sub>4</sub>	55	28.0	18.7		43.0	26.2	
淋巴结转移				<0.001			<0.001
无	30	79.4	75.4		82.9	75.0	
有	71	31.7	22.4		42.3	28.5	
MMP-9 表达				<0.001			<0.001
低	46	78.3	68.9		84.7	73.2	
高	55	17.9	11.2		27.8	15.0	

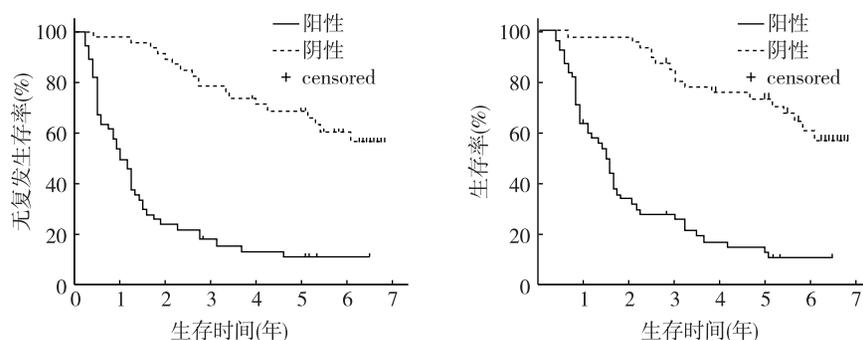


图 2 MMP-9 表达与胃癌患者预后的关系

表 3 影响胃癌患者预后的 Cox 风险比例模型分析

因素	RFS		OS	
	HR(95%CI)	P	HR(95%CI)	P
肿瘤大小	1.750(1.036~2.953)	0.036	1.676(0.999~2.810)	0.050
肿瘤位置	1.180(0.586~2.376)	0.644	1.320(0.638~2.733)	0.455
浸润深度	1.550(0.838~2.868)	0.162	1.361(0.727~2.549)	0.336
淋巴结转移	3.080(1.331~7.127)	0.009	2.346(1.038~5.502)	0.040
MMP-9 表达	3.850(2.092~7.086)	<0.001	4.168(2.212~7.857)	<0.001

文献报道 MMP-9 蛋白的表达还与恶性肿瘤的预后相关;Li 等<sup>[14]</sup>采用 Meta 分析探讨 MMP-9 蛋白表达在卵巢癌中的预后价值,结果发现, MMP-9 表达与卵巢癌预后相关,下调 MMP-9 蛋白表达能够改善卵巢癌的预后。Liu 等<sup>[15]</sup>采用免疫组化法检测基底细胞型乳腺癌中 MMP-9 的表达与预后的关系,结果显示,肿瘤中 MMP-9 高表达与预后差密切相关。本研究通过对不同 MMP-9 表达的胃癌患者进行生存分析发现, MMP-9 高表达患者的中位 RFS 和 OS 明显较其低表达者差,提示 MMP-9 表达状况可作为胃癌复发、转移及预后的分子指标。将与预后相关的临床病理参数及 MMP-9 表达纳入 Cox 风险比例模型进行分析,结果显示,肿瘤直径、淋巴结转移和 MMP-9 表达均可作为胃癌复发、转移及预后的独立预测因子。因此,临床上可根据 MMP-9 表达情况对胃癌术后患者进行筛选。MMP-9 高表达的高危患者,需加强术后复查及辅助治疗;而 MMP-9 低表达的低危患者,则可适当减少术后复查及治疗,以避免治疗不足或治疗过度,从而达到个体化治疗的目的。

综上所述, MMP-9 在胃癌中表达增加,与胃癌侵袭转移及预后有关,将可能成为判断胃癌预后的分子指标,且不排除作为胃癌治疗的潜在分子靶点的可能性,但 MMP-9 在胃癌中如何发挥致癌作用的机制尚需进一步深入研究。

## 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 ] Ogawa M, Suzuki J, Takayama K, et al. Matrix metalloproteinase suppression induced by clarithromycin in murine cardiac allografts [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41 ( 1 ):395-397.
- [ 3 ] 杨金凤,王萍,张庆,等. 胃癌中 RhoC、CD44v6、MMP-9 和 VEGF 的表达及相关性研究[J]. *临床肿瘤学杂志*, 2009, 14 ( 2 ):130-133.
- [ 4 ] 刘爱东,庞久玲,郭红辉. 基质金属蛋白酶-9 在胃癌中的表达及意义[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20 ( 18 ):2226-2227.
- [ 5 ] Edge SB, Compton CC. The American joint committee on cancer: The 7th edition of the ajcc cancer staging manual and the future of TNM[J]. *Ann Surg Oncol*, 2010, 17 ( 6 ):1471-1474.
- [ 6 ] Wang J, Cui S, Zhang X, et al. High expression of heat shock protein 90 is associated with tumor aggressiveness and poor prognosis in patients with advanced gastric cancer [J/OL]. *PLoS One*, 2013 [ 2014-04-12 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23638161>.
- [ 7 ] Liu D, Guo H, Li Y, et al. Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases ( mmps ) and risk of cancer metastasis: A meta-analysis [J/OL]. *PLoS One*, 2012 [ 2014-04-12 ]. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22348060>.
- [ 8 ] Shuman Moss LA, Jensen-Taubman S, Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases: Changing roles in tumor progression and metastasis[J]. *Am J Pathol*, 2012, 181 ( 6 ):1895-1899.
- [ 9 ] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases[J]. *Amino Acids*, 2011, 41 ( 2 ):271-290.
- [ 10 ] Roomi MW, Monterrey JC, Kalinovsky T, et al. Distinct patterns of matrix metalloproteinase-2 and-9 expression in normal human cell lines[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21 ( 3 ):821-826.
- [ 11 ] Reis ST, Leite KR, Piovesan LF, et al. Increased expression of MMP-9 and IL-8 are correlated with poor prognosis of bladder cancer[J]. *BMC Urol*, 2012, 12:18.
- [ 12 ] 李冬霞,李巧香,冯艳玲. KAI1/CD82 和 MMP-9 蛋白表达与胃癌浸润转移的关系[J]. *实用医学杂志*, 2010, 26 ( 18 ):3337-3339.
- [ 13 ] Zhao F, Zhang Q, Kang C, et al. Suppression of matrix metalloproteinase-9 expression by RNA interference inhibits SGC7901 gastric adenocarcinoma cell growth and invasion in vitro and in vivo[J]. *Med Oncol*, 2010, 27 ( 3 ):774-784.
- [ 14 ] Li LN, Zhou X, Gu Y, et al. Prognostic value of MMP-9 in ovarian cancer: A meta-analysis[J]. *APJCP*, 2013, 14 ( 7 ):4107-4113.
- [ 15 ] Liu Y, Xin T, Jiang QY, et al. CD147, MMP-9 expression and clinical significance of basal-like breast cancer[J]. *Med Oncol*, 2013, 30 ( 1 ):366.

收稿日期:2014-02-18; 修回日期:2014-05-09