

肝细胞肝癌组织中 Bcl-2 核表达及 MMP-2 和 MMP-9 表达与术后复发 转移及预后的关系*

孙涛^① 孙保存^{①②} 赵秀兰^① 赵楠^① 古强^① 车娜^① 董学易^①
池嘉栋^①

摘要 目的:探讨抗凋亡蛋白 Bcl-2、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)和 MMP-9 在肝细胞肝癌中表达的关联性,及其与复发、转移和预后的关系。方法:以石蜡包埋组织切片,免疫组织化学 SP 法染色检测 97 例肝细胞肝癌,分别在复发与转移组 49 例和非复发与转移组 48 例中分析 Bcl-2 核表达和 MMP-2、MMP-9 表达的情况。结果:复发与转移组 Bcl-2 核表达高于无复发与转移组 ($\chi^2=7.912, P=0.005$),复发转移组 MMP-9 表达高于无复发转移组 ($\chi^2=6.545, P=0.011$),Bcl-2 核表达阳性细胞率与 MMP-9 阳性细胞率存在相关性,而与 MMP-2 无关。Bcl-2 核表达组患者生存时间较短,差异具有统计学意义。结论:Bcl-2 核表达阳性患者更易出现复发与转移,且与 MMP-9 过度表达存在关联性,表明 Bcl-2 入核可能对肿瘤转移的相关生物学功能具有调节作用,可作为评价 HCC 复发与转移、不良生存预后的候选临床标志。

关键词 Bcl-2 MMP-2 MMP-9 复发与转移

doi:10.3969/j.issn.1000-8179.2012.11.004

Relationship of Bcl-2 Expression with MMP2 and MMP9 Expression in Hepatocellular Carcinoma, and Their Correlation with Recurrence, Metastasis, and Prognosis

Tao SUN¹, Baocun SUN^{1,2}, Xiulan ZHAO¹, Nan ZHAO¹, Qiang GU¹, Na CHE¹, Xueyi DONG¹, Jiadong CHI¹

Correspondence to: Baocun SUN; E-mail: sunbaocun@yahoo.com.cn

¹Department of Pathology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China

²Department of Pathology, Cancer Institute and Hospital of Tianjin Medical University, Key Laboratory of Cancer Prevention and Treatment of Tianjin City, Tianjin 300060, China

This work was supported by the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (No. 30830049), the National Natural Science Foundation of China (No. 30830049), and the Cooperation Project of China-Sweden (No. 09ZCZDSF04400)

Abstract Objective: To determine the correlation of the expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 with the expression of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 in human hepatocellular carcinoma, and their relationship with recurrence, metastasis, and prognosis. **Methods:** Paraffin-embedded tissue sections of 97 hepatocellular carcinoma cases were subjected to SP immunohistochemical staining. The nuclear expression of Bcl-2 as well as the expression of MMP-2 and MMP-9 were detected. A total of 49 cases had recurrence and metastasis, and the remaining 48 did not. **Results:** The nuclear expression of Bcl-2 was higher in cases with recurrence and/or metastasis ($t = -2.488, P = 0.015$). Similarly, MMP-2 and MMP-9 expression were higher in cases with recurrence and/or metastasis ($Z = -2.623, P = 0.009; Z = -2.028, P = 0.043$). The nuclear expression of Bcl-2 was correlated with the expression of MMP-9, but not with that of MMP-2. Patients with positive nuclear expression of Bcl-2 had shorter survival time, and the difference was significant. **Conclusion:** The nuclear expression of Bcl-2 was significantly correlated with metastasis and MMP-9 expression. Bcl-2 relocation into the nucleus may regulate metastasis-related proteins, which can be used as a clinical marker for evaluating recurrence, metastasis, and prognosis.

Keywords Bcl-2; MMP-2; MMP-9; Recurrence and metastasis

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是临床最常见的恶性肿瘤之一,位居恶性肿瘤发生率的第5位和死亡率的第3位。肝癌的复发与转移与预后密切相关,一般认为肿瘤细胞的塑形运动能力与肿瘤血管生成是促使复发和转移的基础^[1-2]。HCC为

上皮起源的恶性肿瘤,肿瘤细胞间存在E-cadherin等黏附蛋白相互连接,当肿瘤细胞发生转移时,E-cadherin会消失,细胞发生塑形,进而获得运动能力^[3-4]。一般认为上皮-间充质转变是调控肿瘤细胞获得运动能力的机制,其主要由TGF- β /SMAD3或PI3K/Akt

作者单位:①天津医科大学病理教研室(天津市300070);②天津医科大学附属肿瘤医院病理科,天津市肿瘤防治重点实验室

*本文课题受国家自然科学基金重点项目(编号:30830049)、面上项目(编号:81173091)和天津市科技支撑项目(中瑞合作,编号:09ZCZDSF04400)资助

通信作者:孙保存 sunbaocun@yahoo.com.cn

等通路所激活,通过Twist和Snail等转录因子改变细胞的表达谱,使之获得Vimentin、VE-cadherin、N-cadherin等间充质表型,进而促进肿瘤细胞运动或内皮化^[5-6]。Bcl-2作为重要的抗凋亡蛋白,参与线粒体膜孔复合物的形成,调节线粒体途径细胞色素C的释放,目前认为其与肿瘤细胞的增殖、衰老和自噬等有着密切的联系,然而Bcl-2是否参与调节EMT、促进肿瘤的演进或肿瘤细胞运动和迁移,目前尚不明了。本研究用人肝细胞肝癌为对象,通过免疫组织化学SP染色观察分析Bcl-2核表达和MMP-2、MMP-9的表达,综合分析三者之间及与复发转移及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 组织标本

选取天津医科大学附属肿瘤医院、天津医科大学总医院2001年2月至2005年11月经手术切除并经病理诊断为HCC随访资料完整的患者97例,其中复发与转移组49例,无复发与转移48例。

1.2 免疫组化染色

1.2.1 主要试剂与方法 兔多抗Bcl-2(sc-492)、鼠单抗MMP-2(sc-58386)和羊多抗MMP-9(sc-6840)及PV6000通用二步法免疫组化试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。实验步骤:5 μm连续切片常规脱蜡水化;3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶30 min;0.01 mol/L枸橼酸盐缓冲液(pH 6.0)微波热修复20 min;正常血清封闭,一抗4℃过夜,二抗孵育,DAB显色,苏木素复染细胞核。Bcl-2、MMP-2和MMP-9采用乳腺癌组织作阳性对照,PBS代替一抗作为阴性对照。

1.2.2 判断标准 染色结果阳性细胞百分率:每例标本选择10个含有阳性细胞的高倍视野(×400)分别计数100个肿瘤细胞,取其平均值计算阳性细胞百分率。

1.3 统计学方法

用SPSS 11.5统计软件进行分析,细胞阳性百分率之间相关性分析采用完全随机 t 检验;生存分析采用Kaplan-Meier法估计生存曲线,对数秩和检验(Log-rank)比较生存曲线的差别; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病例基本情况

97例肝癌患者中,复发与转移组49例,平均生存时间(26.4±3.3)个月;无复发与转移组48例,平均生存时间(46.8±3.3)个月,组间差异具有统计学意义($P < 0.001$)。

2.2 Bcl-2表达

Bcl-2阳性表达产物呈棕黄色,绝大多数定位于肿瘤细胞细胞浆,多集中于核膜附近。在部分病例的肿瘤组织中,Bcl-2可出现核表达,呈局灶性,往往伴随细胞浆表达。Bcl-2浆表达在复发、转移组与无复发、转移两组间差异无统计学意义,而Bcl-2核表达差异具有统计学意义,且转移与复发组高于非转移与复发组($\chi^2=7.912, P=0.005$,表1)。

2.3 MMP-2、MMP-9表达

阳性表达产物主要表达于肝癌细胞癌的细胞浆和少数细胞的细胞核上,呈棕黄色,复发与转移组MMP-9表达呈大片状弥漫分布,高于无复发与转移组($\chi^2=6.545, P=0.011$),无复发与转移组则表现为阳性细胞散在分布;MMP-2则在二组间的差异无统计学意义(表1)。

表1 肝癌Bcl-2、MMP-2和MMP-9阳性细胞率与复发转移的关系 例

Table 1 Relationships of the positive rates of Bcl-2, MMP-2, and MMP-9 with metastasis

项目	复发与转移		χ^2	P	
	+	-			
Bcl-2浆阳性	+	12	10	0.251	0.617
	-	28	30		
Bcl-2核阳性	+	20	8	7.912	0.005*
	-	20	32		
MMP-2	+	25	32	2.990	0.084
	-	15	8		
MMP-9	+	31	20	6.545	0.011*
	-	9	20		

* $P < 0.05$

2.4 Bcl-2核表达与MMP-2和MMP-9表达之间的关系

比较MMP-2和MMP-9阳性细胞率与Bcl-2核阳性率可见,Bcl-2核阳性率仅与MMP-9阳性表达率之间存在相关性,差异具有统计学意义($r=0.281, P=0.012$),而MMP-2与Bcl-2核表达之间的相关性不具有统计学意义(图1)。

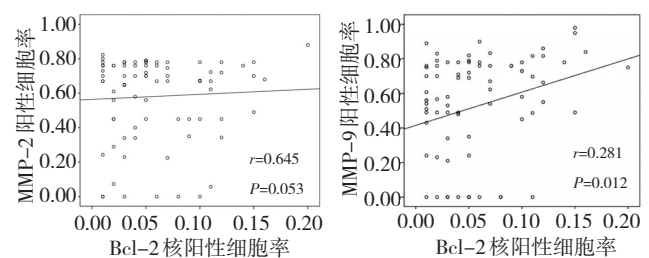


图1 MMP-2、MMP-9阳性细胞率与Bcl-2核阳性细胞率间的相关性分析

Figure 1 Correlation of the positive rates of MMP-2 and MMP-9 with Bcl-2

2.5 Bcl-2表达与生存预后的关系

经Kaplan-Meier生存分析结果显示,Bcl-2核阳性与患者的总生存期密切相关($P=0.001$),Bcl-2浆阳性则与患者的总生存期之间的相关性无统计学意义($P=0.160$,图2)。

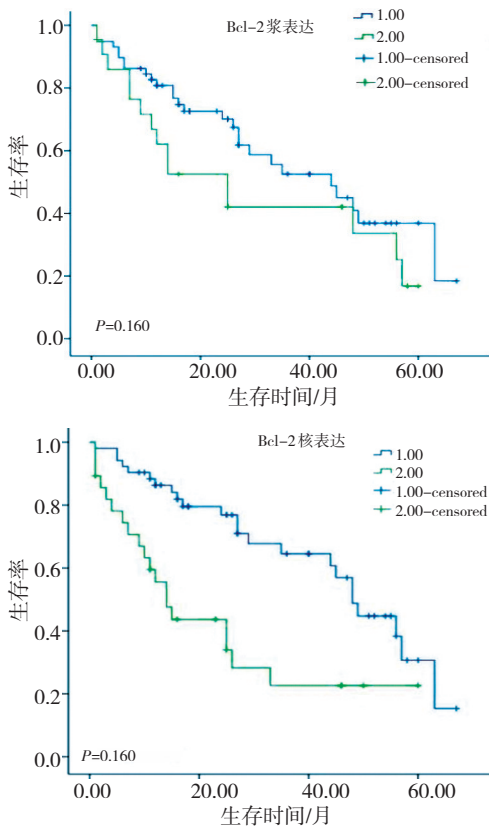


图2 Bcl-2浆表达和核表达与生存时间的关系

Figure 2 Relationship between Bcl-2 expression and survival time

3 讨论

肝癌的复发与转移是决定预后和导致患者死亡的主要原因,肿瘤细胞在特定的微环境下会有不同的响应,包括凋亡、老化、分泌功能改变和塑形运动,而这种微环境中最关键的因素就是缺氧^[7]。缺氧可以诱导肿瘤细胞内HIF-1的表达上调,激活多条信号转导通路促进肿瘤细胞的增殖、诱导EMT(Epithelial-mesenchymal transition)或分泌VEGF等因子,使得单个肿瘤细胞或肿瘤细胞群体发生适应缺氧的改变,其结局为部分肿瘤细胞死亡(凋亡为主)以换取整个细胞群体的平衡、肿瘤细胞塑形后转移到合适的部位再定植、肿瘤细胞通过分泌因子或模拟血管生成获得血液以解除缺氧。其中肿瘤细胞转移和肿瘤血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)形成均涉及肿瘤细胞失去原有的上皮来源黏附分子,获得间充质表型(如Vimentin、N-cadherin或VE-cadherin),此时细胞失去极性、获得运动能力并开始迁移或者

细胞间结构重塑^[8-10]。

Bcl-2是第一个被发现的抗凋亡相关蛋白,在发育、疾病等多个领域有重要的意义。Bcl-2家族包括多个成员,它们在细胞凋亡过程中的作用不尽相同,但大多数仍与线粒体膜孔结构和细胞色素C的释放有关,如经典的Bcl-2/Bax蛋白二聚体。Bcl-2家族包括6个经典的抗凋亡蛋白、3个结构类似的前凋亡蛋白(pro-apoptosis)和结构差别较大的相互作用蛋白,它们共同通过级联作用调控细胞的死亡过程,包括凋亡和坏死^[11-12]。进一步的研究发现,其还可以通过修饰、与其他蛋白发生相互作用调节细胞的代谢、免疫应答和自噬。这些均表明Bcl-2家族蛋白可能在细胞生长和死亡调控中充当更为复杂的角色。在某些恶性肿瘤中Bcl-2蛋白可以在内质网、细胞核等非线粒体部位表达,并且与肿瘤的预后相关,这是否暗示了Bcl-2可能和肿瘤演进中其他机制有关联,目前尚不清楚。

基质金属蛋白酶(MMPs)家族,主要功能为降解细胞外基质,与肿瘤的侵袭转移有密切的关系^[13]。在肿瘤侵袭过程中,肿瘤细胞通过塑形具备了迁移能力,而穿过基底膜则需要借助分泌MMPs来降解基底膜和细胞外基质,从而获得继续迁移的道路和空间基础^[14-17]。MMP-2和MMP-9是MMPs家族中非常重要的两种分子,均为明胶酶,二者的活性表征了肿瘤细胞的迁移能力和侵袭能力的强弱,即恶性度高低。本研究结果发现,仅MMP-9与肝癌的复发与转移、生存时间均具有相关性,且Bcl-2的核表达与MMP-9阳性细胞率相关,表明Bcl-2核表达与肿瘤细胞产生MMP-9存在关联性,进一步研究发现MMP-9和Bcl-2均与患者生存时间呈负相关。MMP-2和MMP-9均与肿瘤转移和肿瘤血管生成有关,但MMP-9在高度恶性肿瘤组织中充当更重要的调节转移和基膜降解的角色。MMP-2与Bcl-2核表达之间并未观察到相关性,这可能由于Bcl-2入核对MMP-2并没有调节作用,也可能表示不同MMP所受调控机制有区别。

综上所述,本研究对肝细胞肝癌Bcl-2、MMP-2和MMP-9的表达进行了临床病理分析,同时结合临床资料对这3个指标与复发转移、生存时间之间的关系进行了比较,最终认为Bcl-2核表达与肝癌的复发与转移密切相关,MMP-9与Bcl-2核表达和肿瘤转移具有密切相关性,而与MMP-2无关。MMP-9和Bcl-2核表达可作为肝癌患者预后评价的指标。

参考文献

- 1 Fransvea E, Angelotti U, Antonaci S, et al. Blocking transforming