

TIMP-4和 MMP-2在胃癌中的表达

孔 晋¹, 吴文涌¹, 吴正升²

摘要 目的 分析金属蛋白酶组织抑制因子-4(TIMP-4)及基质金属蛋白酶-2(MMP-2)在胃癌(GC)及癌旁非肿瘤组织中的表达,并探讨其在胃癌中的临床意义。方法 采用免疫组织化学法分析75例胃腺癌组织及42例癌旁非肿瘤组织中TIMP-4蛋白和MMP-2蛋白表达水平,同时采用Pearson相关分析法分析TIMP-4蛋白和MMP-2蛋白之间的相关性。TCGA数据库中Kaplan-Meier生存分析胃癌中TIMP-4和MMP-2的高表达与患者总生存期的相关性。结果 75例GC组织中,TIMP-4蛋白阳性65例(86.67%),MMP-2蛋白阳性68例(90.67%),癌旁非肿瘤组织TIMP-4阳性22例(52.38%),癌旁非肿瘤组织MMP-2阳性23例(54.76%),癌组织与癌旁非肿瘤组织相比差异均有统计学意义($P < 0.01$);MMP-2蛋白的表达与肿瘤与淋巴结转移及胃癌分期相关且差异有统计学意义($P < 0.001$);但与性别、年龄、肿瘤大小以及分化程度无统计学相关。TIMP-4蛋白表达与性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤淋巴结转移、肿瘤分化程度及分期均无关联($P > 0.05$)。Pearson相关分析表明TIMP-4蛋白和MMP-2蛋白表达呈正相关($r = 0.351, P < 0.001$)。Kaplan-Meier生存分析显示TIMP-4、MMP-2高表达的胃癌患者预后较差。结论 TIMP-4和MMP-2蛋白均在胃癌组织中高表达,其高表达均提示胃癌患者预后较差,可能共同参与胃癌的发生发展,有望成为预测胃癌转移的潜在生物学标志物。
关键词 金属蛋白酶组织抑制因子-4;基质金属蛋白酶-2;胃癌;免疫组化
中图分类号 R 735.2
文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0965-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.028

胃癌(gastric cancer, GC)是世界第五大常见的癌症,近年来发病率在不断上升^[1]。胃癌预后较差,5年生存率低于30%,部分原因是肿瘤细胞的快速侵袭和转移^[2]。侵袭与转移是恶性肿瘤的重要生物学行为之一,其过程包括细胞转移相关基因基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinase family,

MMPs)、金属蛋白酶组织抑制因子(tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)等的失调。细胞外基质(extracellular matrix, ECM)蓄积是肿瘤侵袭和转移的重要因素。ECM受MMPs及其内源性抑制剂TIMPs的调节。MMPs组织TIMP-4是一种抑制MMPs活性的蛋白质。研究^[3]表明TIMP-4表达与神经胶质瘤的预后、分期及疾病进展相关。TIMP-4在胃癌中的表达情况及其与患者预后关系的研究较少。TIMP-4通过抑制MMPs介导的活化来调节明胶酶A的活性。MMP-2是恶性肿瘤侵袭和转移的标志,参与ECM和基底膜IV型胶原的降解,在细胞迁移过程中起重要作用^[4]。因此该研究从蛋白水平探讨胃癌中TIMP-4和MMP-2表达情况,并分析两者之间关联性,为研究GC的发生、发展机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 病例资料 收集安徽医科大学第一附属医院2013年10月~11月通过手术切除经病理证实的、临床病理资料完整的GC组织存档蜡块75例。所有患者术前均未接受过放疗、化疗或生物治疗等干预措施。其中男55例,女20例,年龄35~81(62 ± 10.22)岁;肿瘤直径 ≤ 5 cm 44例, > 5 cm 31例;淋巴结转移54例,无淋巴结转移21例;按胃癌分化程度:中高分化腺癌30例,低分化腺癌45例;按第8版国际抗癌联盟和美国癌症联合委员会胃癌TNM分期标准^[5]: I期+II期36例,III期+IV期39例。收集相应癌旁组织(距癌组织边缘2 cm以上)存档蜡块42例。参与本次研究的所有患者均同意并签署知情同意书。相关样品的收集和处理都是在遵守《赫尔辛基宣言》^[6]的情况下进行并经安徽医科大学第一附属医院伦理委员会批准。

1.2 主要试剂与仪器 兔抗人TIMP-4(12326-1-AP,工作浓度1:100)多克隆抗体及鼠抗人MMP2(66366-1-1g,工作浓度1:75)单克隆抗体均由美国Proteintech Group公司生产;即用型快速免疫组化MaxVision™检测试剂盒(KIT5020)购自福州迈新公司;DAB显色剂(ZLI9018)购自北京中杉金桥生

2020-03-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81572305)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院普外科,合肥 230022²安徽医科大学病理学教研室,合肥 230032

作者简介:孔 晋,男,硕士研究生;

吴文涌,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: 13805694400@126.com

物技术有限公司; OlympusCX22 生物显微镜购自日本 Olympus 公司。

1.3 实验方法 所有收集的组织存档蜡块经 4 μm 厚连续切片,行免疫组织化学染色。染色结果经 2 名经验丰富的病理科医师采用双盲原则评定。免疫组化染色采用 EnVision 法。主要步骤如下:4 μm 厚的石蜡切片 65 °C 烤片,脱蜡水化,经柠檬酸钠缓冲液高压加热抗原修复 3% H₂O₂ 作用 10 min 阻断内源性过氧化物酶的活性。一抗(MMP-2、TIMP-4) 4 °C 过夜孵育,PBS 清洗后每张切片滴加生物素标记的二抗工作液,37 °C 干燥箱孵育 30 min,DAB 显色剂显色,苏木精复染,常规脱水,透明,封片。显微镜下观察染色情况,阳性对照使用 MMP-2、TIMP-4 表达良好的胃组织,PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判断 对 TIMP-4 和 MMP-2 的表达水平进行半定量的评估。显微镜下观察切片,以细胞质内出现明显的棕黄色颗粒为阳性。对阳性细胞进行染色程度的得分评判,同时对阳性细胞进行计数。将染色强度和阳性细胞百分比结合判断 TIMP-4 和 MMP-2 蛋白免疫组化结果。结果判断采用半定量积分法:① 着色强度打分:0 分,细胞无着色;1 分,细胞着色为浅黄色;2 分,细胞着色为棕黄色;3 分,细胞着色为棕褐色;染色强度需与背景着色相对比。② 根据阳性细胞所占百分比打分:0 分,阴性;1 分,阳性细胞 ≤ 10%;2 分,阳性细胞 > 10% ~ 50%;3 分,阳性细胞 > 50% ~ 75%;4 分,阳性细胞 > 75%。按着色强度分值与阳性细胞百分比分值乘积结果将切片分为 4 个等级“-”:0 ~ 2 分;“+”:3 ~ 5 分;“++”:6 ~ 8 分;“+++”:9 ~ 12 分;以 ≥ 3 分判定为免疫反应阳性^[7]。

1.5 Kaplan-Meier 生存分析和临床表达分析 Kaplan-Meier plotter (<http://kmplot.com/analysis/>) 是一个综合的在线平台,可基于 10 293 例癌症样品评估 54 675 个基因对生存的影响。本研究使用 Kaplan-Meier 绘图仪评估 TIMP-4 和 MMP-2 的预后价值及其在胃癌患者中的表达。从 TCGA 数据库获得 527 例胃癌组织和 349 例癌旁组织中 TIMP-4 mRNA 表达数据;以及 570 例胃癌组织和 306 例匹配的癌

旁正常组织中 MMP-2 mRNA 表达数据。

1.6 统计学处理 采用 SPSS 23.0 软件进行分析,各组间比较采用 χ² 检验,指标间的相关性分析采用 Pearson 相关分析。构建 Kaplan-Meier 曲线以确定患者总生存率(overall survival, OS)。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TIMP-4 和 MMP-2 蛋白在 GC 组织以及癌旁组织中的表达 TIMP-4 和 MMP-2 蛋白均定位于细胞质,蛋白阳性表达时染色呈棕黄色颗粒(图 1)。75 例 GC 组织中,65 例(86.67%)TIMP-4 蛋白阳性表达,有 68 例(90.67%)MMP-2 蛋白表达为阳性;而在 42 例癌旁组织中,仅 22 例(52.38%)TIMP-4 蛋白阳性表达,23 例(54.76%)MMP-2 蛋白表达为阳性。TIMP-4 蛋白与 MMP-2 蛋白在胃癌组织表达均较癌旁组织中高且差异均有统计学意义(P < 0.001)(表 1)。

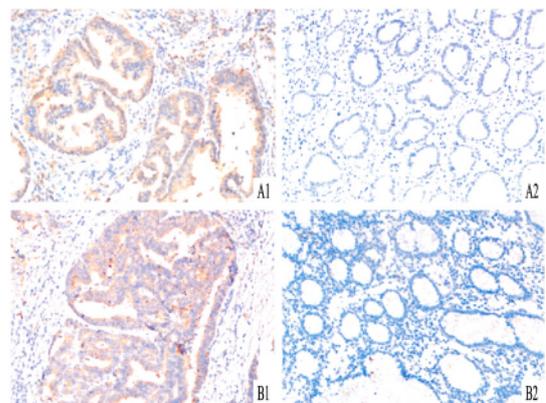


图 1 胃癌组织与癌旁组织中 TIMP-4 和 MMP-2 免疫组化结果 En Vision 法 × 200
A: TIMP-4; B: MMP-2; 1: 胃癌组织; 2: 癌旁组织

2.2 TIMP-4 和 MMP-2 蛋白在 GC 患者中的表达与相关临床病理参数的关系 在胃癌患者中,TIMP-4 蛋白表达与性别、年龄、肿瘤大小、淋巴结转移、肿瘤分化程度及分期均无统计学意义(P > 0.05)。MMP-2 蛋白的高表达与淋巴结转移及胃癌分期相关且差异有统计学意义(P < 0.001);但与性别、年

表 1 TIMP-4 蛋白和 MMP-2 蛋白在胃癌组织和癌旁组织中的表达(n)

组别	TIMP-4 蛋白表达				MMP-2 蛋白表达			
	阳性	阴性	χ ² 值	P 值	阳性	阴性	χ ² 值	P 值
胃癌组织(n = 75)	65	10	16.599	< 0.001	68	7	20.081	< 0.001
癌旁组织(n = 42)	22	20			23	19		

表2 TIMP-4 和 MMP-2 蛋白表达和临床病理特征的关系 [n(%)]

临床特征	n	TIMP-4 阳性	χ^2 值	P 值	MMP-2 阳性	χ^2 值	P 值
性别							
男	55	47(85.5)	0.262	0.609	51(92.7)	1.035	0.309
女	20	18(90.0)			17(85.0)		
年龄(岁)							
≤64	40	36(90.0)	0.824	0.364	37(92.5)	0.340	0.560
>64	35	29(82.9)			31(88.6)		
肿瘤大小(cm)							
≤5	44	37(84.1)	0.611	0.434	38(86.4)	2.329	0.127
>5	31	28(90.3)			30(96.8)		
淋巴结转移							
无	21	19(90.5)	0.366	0.545	15(71.4)	12.756	<0.001
有	54	46(85.2)			53(98.1)		
分化程度							
中高度	30	25(83.3)	0.481	0.488	25(83.3)	3.178	0.075
低	45	40(88.9)			43(95.6)		
分期							
I 期 + II 期	36	33(91.7)	1.498	0.221	30(83.3)	4.400	0.036
III 期 + IV 期	39	32(82.1)			38(97.4)		

龄、肿瘤大小以及分化程度无相关性,见表2。

2.3 GC 组织中 TIMP-4 和 MMP-2 表达的相关性分析 Pearson 相关分析表明,在 75 例 GC 组织中 TIMP-4 和 MMP-2 表达水平呈正相关且有统计学意义($r=0.351, P<0.001$)。

2.4 TIMP-4 和 MMP-2 Kaplan-Meier 生存分析和临床表达分析 使用在线生物信息学工具 Kaplan-Meier 绘图仪检索,结果显示 TIMP-4、MMP-2 高表达的胃癌患者 OS 降低(图2)。

3 讨论

根据世界卫生组织的数据,胃癌是全球最常见的第五种癌症和第三大癌症死亡原因^[1-2]。在我国胃癌死亡率居全国第二,由于缺乏特异性的早期筛查和诊断方法,大量胃癌患者在初诊时已进展到晚期,预后较差,5 年生存率不超过 25%^[8]。胃癌作为最常见的恶性肿瘤之一,早期诊断和治疗已成为一个亟待解决的问题。研究^[9]表明幽门螺杆菌感染、细胞增殖与细胞周期功能障碍、血管生成细胞浸润和转移等一系列复杂的分子生物学过程参与了胃癌的发生发展。肿瘤侵袭和转移是胃癌患者死亡的主要原因^[10]。然而,胃癌转移的机制尚不完全清楚。因此,有必要对胃癌转移等生物学行为进行研究,为制定最有效的个体化治疗方案,提高临床疗效提供理论依据。

TIMP-4 是一种抑制金属蛋白酶活性的蛋白质,通过有效抑制 MT1MMP 介导的活化来调节明胶酶

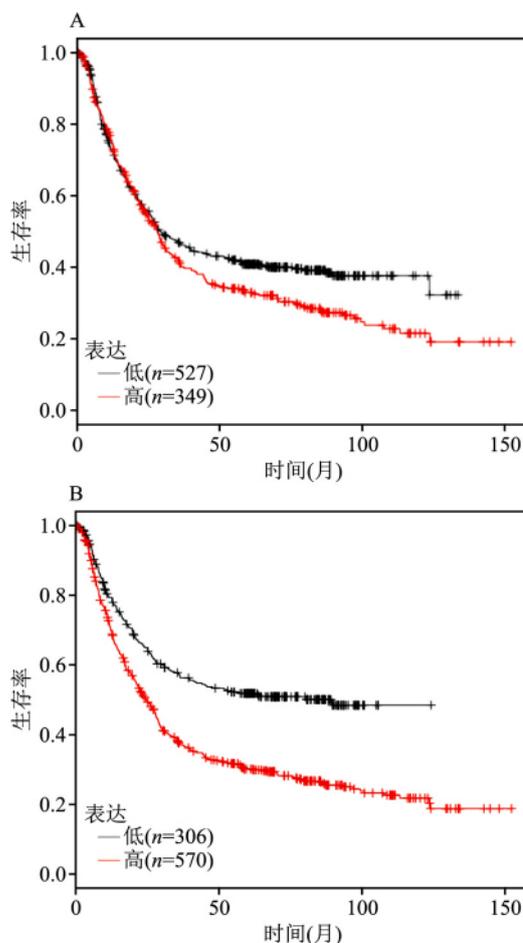


图2 基于 TIMP-4、MMP-2 的总生存期 Kaplan-Meier 生存曲线 A: TIMP-4; B: MMP-2

A 的活性。有研究^[11]表明 TIMP-4 在乳腺癌中高表达能够抑制肿瘤生长,在子宫内膜癌中 TIMP-4 过表

达与侵袭有关,而在宫颈癌中 TIMP-4 高表达与疾病晚期相关。然而 TIMP-4 在胃癌中的作用仍未见报道。蛋白水解酶在细胞外基质的降解过程中起着关键的作用, MMPs 是一种重要的蛋白水解酶^[12-13]。MMP-2 作为 MMPs 家族的重要成员,在胃癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌等多种肿瘤中高表达,其表达与肿瘤分期、淋巴浸润、淋巴结转移及复发密切相关^[14-15]。

本研究分析了 75 例胃癌组织及 42 例癌旁组织中 MMP-2 蛋白和 TIMP-4 蛋白表达水平。结果显示 90.67% 的胃癌组织中 MMP-2 蛋白阳性表达,并且 MMP-2 蛋白高表达与肿瘤淋巴结转移显著相关($P < 0.001$),同时与胃癌分期存在一定统计学关联,这与前人的研究^[9]是一致的,说明 MMP-2 可以作为预测胃癌预后的潜在标志物;75 例胃癌组织中 TIMP-4 蛋白的阳性表达率为 86.67%,高于癌旁组织,但与胃癌转移、分期和分化程度等无明显统计学关联。说明 TIMP-4 可能作为胃癌早期诊断的标志物。Spearman 相关性分析显示,胃癌组织中 MMP-2 蛋白表达水平与 TIMP-4 蛋白表达水平有统计学相关性且呈正相关关系($r = 0.351, P < 0.001$),说明联合检测 MMP-2 与 TIMP-4 这两项指标更有助于胃癌患者的诊断及预后评估。同时 Kaplan-Meier 生存分析验证了肿瘤患者中 MMP-2、TIMP-4 高表达,并预示着更短的总生存期($P < 0.05$)。

综上, MMP-2 与 TIMP-4 在胃癌组织中高表达,且其高表达均提示胃癌患者预后较差,可作为胃癌诊断和预后的潜在标志物。

参考文献

- [1] Siegel R L, Miller K D, Jemal A. Cancer Statistics, 2017 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] Lukaszewicz-Zajac M, Mroczko B, Szmitkowski M. Gastric cancer—The role of matrix metalloproteinases in tumor progression [J]. *Clin Chim Acta* 2011, 412(19-20): 1725-30.
- [3] Rorive S, Lopez X M, Maris C, et al. TIMP-4 and CD63: new prognostic biomarkers in human astrocytomas [J]. *Mod Pathol* 2010, 23(10): 1418-28.
- [4] Jeziarska A, Motyl T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review [J]. *Med Sci Monit*, 2009, 15(2): RA32-40.
- [5] 刘光芝, 黄镇, 王子卫. 第 8 版国际抗癌联盟和美国癌症联合委员会胃癌 TNM 分期系统简介及解读 [J]. *腹部外科*, 2017, 30(4): 241-5.
- [6] 王 颀, 杨 竟, 陈仲林, 等. 2013 版《赫尔辛基宣言》的修订及其意义的分析研究 [J]. *中国医学伦理学* 2015, 28(4): 618-21.
- [7] 李志贵. 胃癌组织中 MMP-2、Prostasin 的表达与临床病理意义 [D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [8] Nagini S. Carcinoma of the stomach: a review of epidemiology, pathogenesis, molecular genetics and chemoprevention [J]. *World J Gastrointest Oncol* 2012, 4(7): 156-69.
- [9] Wang T, Hou J, Jian S, et al. miR-29b negatively regulates MMP2 to impact gastric cancer development by suppress gastric cancer cell migration and tumor growth [J]. *J Cancer* 2018, 9(20): 3776-86.
- [10] Yang D, Hendifar A, Lenz C, et al. Survival of metastatic gastric cancer: significance of age, sex and race/ethnicity [J]. *J Gastrointest Oncol* 2011, 2(2): 77-84.
- [11] Hilska M, Roberts P J, Collan Y U, et al. Prognostic significance of matrix metalloproteinases-1, 2, 7 and-13 and tissue inhibitors of metalloproteinases-1, 2, 3 and-4 in colorectal cancer [J]. *Int J Cancer* 2007, 121(4): 714-23.
- [12] Kalluri R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis [J]. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(6): 422-33.
- [13] Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment [J]. *Cell* 2010, 141(1): 52-67.
- [14] Chan O T M, Furuya H, Pagano I, et al. Association of MMP-2, RB and PAI-1 with decreased recurrence-free survival and overall survival in bladder cancer patients [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(59): 99707-21.
- [15] Shi Y, An D, Liu Y, et al. Propoxur enhances MMP-2 expression and the corresponding invasion of human breast cancer cells via the ERK/Nrf2 signaling pathway [J]. *Oncotarget* 2017, 8(50): 87107-23.

Expression of TIMP-4, MMP-2 in gastric cancer

Kong Jin¹, Wu Wenyong¹, Wu Zhengsheng²

(¹Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University Hefei 230022;

²Dept of Pathology, Anhui Medical University Hefei 230032)

Abstract Objective To analyze the expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-4 (TIMP-4) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in gastric cancer (GC) and adjacent tissues, and to explore their clinical significance in GC. **Methods** The expression levels of TIMP-4 protein and MMP-2 protein in 75 cases of gastric adenocarcinoma tissues and 42 adjacent tissues were analyzed by immunohistochemical method, and the correlation between

网络出版时间: 2020/5/29 13:04 网络出版地址: http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20200527.1643.029.html

胎子宫前后径、左右径及内膜与孕周的相关性研究

王澳琦¹, 邱文倩¹, 张超学¹, 周怡¹, 张英², 袁静², 姜书情¹

摘要 目的 建立胎子宫前后径、左右径及内膜的正常值范围,为发现子宫发育异常及诊断两性畸形奠定基础。方法

研究对象是 213 例孕周在 21~41 周之间的孕妇,进行超声测量胎子宫前后径、左右径及内膜厚度,分析子宫发育与孕周之间的相关性。结果 在 213 例胎子宫检查中获得了充分的测量值,在 21~34 孕周范围内,用回归方程表示子宫前后径、左右径及内膜与孕周的关系:前后径(mm) = $1.240 \times \text{孕周} (r = 0.887, P < 0.001) - 23.969$,左右径(mm) = $1.579 \times \text{孕周} (r = 0.915, P < 0.001) - 30.968$,内膜厚(mm) = $0.802 \times \text{孕周} (r = 0.892, P < 0.001) - 16.585$;在区间 35~41 周,采用 t 分布法求其总体均数的 95% 置信区间为:前后径(15.992, 17.092) mm、左右径(20.478, 21.627) mm、内膜(8.805, 9.910) mm。子宫前后径、左右径、内膜厚度三者两两之间均呈线性关系。结论 子宫前后径、左右径及内膜厚度在 34 周前随着孕周的增加而增加,34 周后达到

缓慢增长期至平台期,不再随孕周的增加而明显增加。

关键词 超声测量; 产前检查; 胎子宫正常值; 生殖系统, 畸形

中图分类号 R 714.5; R 445.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)06-0969-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.06.029

基因遗传及母体环境均有可能导致子宫的发育异常。随着超声成像技术的进展和完善,其对胎子宫的诊断价值已获肯定,可以早期发现胎子宫发育异常及其他相关疾病,做到尽早干预。胎儿生殖系统各个器官随孕周增加都会发生变化,产前超声筛查胎儿生殖系统异常可行,但并不能发现所有异常^[1]。目前尚缺乏较为统一的胎子宫发育正常值,该研究通过分析胎子宫大小与孕周关系,为胎子宫发育提供参考。

1 材料与方法

1.1 病例资料 随机选取 2018 年 8 月~2019 年 10 月在我院规律产检并在本院分娩的孕妇,经腹超声筛选孕周 > 21 周的单胎孕妇共 213 例。入选标

2020-04-01 接收

基金项目:安徽省重点研究与开发项目(编号 201904a07020046)

作者单位:安徽医科大学第一附属医院¹ 超声科、² 妇产科,合肥 230022

作者简介:王澳琦,女,硕士研究生;

张超学,男,副教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail: zcxay@163.com

TIMP-4 protein and MMP-2 protein was analyzed by Pearson correlation analysis. Kaplan-meier survival analysis of GC in TCGA was performed to analyze the correlation between high TIMP-4 and MMP-2 expression in GC and overall survival. **Results** Among 75 GC tissues, 65 cases were positive for TIMP-4 protein (86.67%), 68 cases were positive for MMP-2 protein (90.67%), and 22 cases were positive for TIMP-4 in non-tumor tissues adjacent to cancer (52.38%), 23 cases of MMP-2 positive in non-tumor tissues adjacent to cancer (54.76%). The differences were statistically significant compared with adjacent tissues ($P < 0.01$). The expression of MMP-2 protein was statistically related to lymph node metastasis ($P < 0.001$) and cancer stage ($P < 0.05$), but it was not statistically related to gender, age, tumor size or degree of differentiation. There was no statistical correlation between TIMP-4 protein expression, gender, age, tumor size, lymph node metastasis, tumor differentiation or cancer stage ($P > 0.05$). Pearson correlation analysis found a positive correlation between MMP-2 protein and TIMP-4 protein expression ($r = 0.351, P < 0.001$). Kaplan-meier survival analysis showed that GC patients with high expression of TIMP-4 and MMP-2 had a poor prognosis. **Conclusion** MMP-2 protein and TIMP-4 protein are highly expressed in GC tissues, and the high expression suggest poor prognosis of GC patients, thus which may jointly participate in the occurrence and development of GC and were expected to become a potential biological marker for predicting metastasis of GC.

Key words tissue inhibitor of metalloproteinase-4; matrix metalloproteinase-2; gastric cancer; immunohistochemistry