

MMP-14 和 CD31-MVD 在结直肠癌组织中的表达及临床意义

马晋疆¹, 李志刚², 侯吉学², 黄桂林²

摘要 目的 探讨基质金属蛋白酶-14(MMP-14)和CD31标记的微血管密度(CD31-MVD)在结肠癌组织中的表达及其与肿瘤的临床意义。方法 采用免疫组织化学方法检测60例结直肠癌患者的癌组织及20例正常切缘组织中MMP-14和CD31-MVD的表达。采用qRT-PCR的方法检测20例新鲜结直肠癌组织及正常切缘组织中MMP-14 mRNA的相对表达量。结果 ①结直肠癌组织中的MMP-14阳性表达率以及CD31-MVD值明显高于正常切缘组织($P < 0.05$); ②MMP-14的表达及CD31-MVD值与肿瘤大小、浸润深度、TNM分期和淋巴结转移有相关性($P < 0.05$),而与患者性别、年龄无明显相关; ③MMP-14的表达与CD31-MVD呈正相关性($P < 0.05$); ④结直肠癌组织中MMP-14 mRNA的相对表达量显著高于正常切缘组织($P < 0.01$)。结论 结直肠癌组织中MMP-14的高表达和CD31标记的肿瘤组织微血管密度与结直肠癌的发生、浸润、转移有密切关系。

关键词 结直肠癌; 基质金属蛋白酶-14; CD31-MVD; 免疫组化; qRT-PCR

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)11-1694-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.025

结直肠癌在国内外都是发病率较高的恶性肿瘤之一,最新的数据表明,2015年中国新发癌症患者429.1万,死亡281.4万,其中结直肠癌新发37.6万,死亡19.1万^[1]。但是大多恶性肿瘤患者并不是死于原发灶,而是肿瘤的侵袭和转移。当癌细胞通过降解周围基底膜迁移侵入邻近血管时,极易发生侵袭和转移。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是一种蛋白溶解酶家族,其主要功能是降解细胞基底膜和细胞外基质(extracellular matrix, ECM),在肿瘤的侵袭和转移过程中有着重要的促进作用^[2]。血小板内皮细胞黏附分子(platelet

endothelial cell adhesion molecule 1, PECAM-1, 又称CD31)属于免疫球蛋白超家族,有研究^[3]证实CD31参与了肿瘤细胞黏附于内皮细胞并促进肿瘤血管形成的过程。该研究应用免疫组织化学和qRT-PCR技术对结直肠癌组织和正常切缘组织中MMP-14和CD31标记的微血管密度(CD31-MVD)的表达进行检测,并检测了癌组织中MMP-14 mRNA的相对表达量。从蛋白质表达和基因转录两个方面简要分析了两者与结直肠癌临床病理的相关性,探讨其与结直肠癌疾病发生发展中的关系及临床意义。

1 材料与方法

1.1 一般材料 选取2015年1月~2016年5月石河子大学医学院第一附属医院病理科经10%甲醛固定和石蜡包埋的结直肠癌组织切片60例(实验组)和距离肿瘤边缘5 cm以上的正常切缘组织20例(对照组)用于免疫组化实验。具体临床病理资料如表1。另选取同时期在本院普外二科住院手术治疗的结直肠癌患者新鲜结直肠癌及正常切缘组

表1 临床病理资料

项目	患者数[n(%)]
年龄(岁)	
≤55	18(30.00)
>55	42(70.00)
性别	
男	35(51.67)
女	25(48.33)
浸润深度	
肌层以内	16(26.67)
肌层以外	44(73.33)
瘤体大小(cm)	
≤3	11(18.33)
>3	49(81.67)
淋巴结有无转移	
无	33(55.00)
有	27(45.00)
脉管内有无瘤栓	
无	50(83.33)
有	10(16.67)
TNM分期	
I+II	30(50.00)
III+IV	30(50.00)

2017-06-20 接收

基金项目: 新疆生产建设兵团卫生科技计划(编号: 2013-32)

作者单位: ¹ 石河子大学医学院, 石河子 832002

² 石河子大学医学院第一附属医院胃肠乳腺外科, 石河子 832002

作者简介: 马晋疆, 男, 硕士研究生;

黄桂林, 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: 13899523416@163.com

组织 20 例用于 qRT-PCR 实验。所有病例符合 WHO 结直肠癌诊断标准; 由病理科确诊; 术前未行放化疗及相关生物靶向治疗; 相关临床资料完整。

1.2 材料和方法

1.2.1 抗体和试剂 MMP-14 兔抗人单克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 货号: ab51074); CD31 兔抗人多克隆抗体 (苏州睿瀛生物有限公司, 货号: RL10571); 免疫组化两步法试剂盒 (武汉博士德公司, 货号: SV0001、SV0002); DAB 显色试剂盒 (北京中杉金桥生物有限公司, 货号: ZLI-9018); TRIzol (美国 Invitrogen 公司); 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo 公司); Real-time PCR 的试剂盒 (上海罗氏公司)。

1.2.2 免疫组化染色 标本 4 μm 连续切片, 经脱蜡水化后, 加 H_2O_2 室温孵育 20 min, PBS 浸泡 3 min, 滴加血清封闭 1 h。加一抗 4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 用 PBS 洗去一抗, 甩干滴加二抗, 室温孵育 30 min。洗去二抗, 滴加 DAB 显色, 水冲, 苏木精染核 5 min, 流水冲洗多余的苏木精, 分化液中分化 1 s, 流水冲洗 5 min, 梯度酒精复水, 用中性树胶封片。

MMP-14 结果判定: MMP-14 蛋白多表达于肿瘤细胞的细胞质, 呈棕黄色或棕褐色。根据样本阳性细胞百分比和染色强度的乘积综合评分, 见表 2。

表 2 免疫组化实验结果判定标准

阳性细胞 百分比	着色强度		评定结果		
	计分(分)	强度	计分(分)	结果	积分(分)
<5%	0	无着色	0	阴性	0~1
6%~25%	1	浅黄色	1	阳性	>1
26%~50%	2	棕黄色	2	-	-
51%~75%	3	棕褐色	3	-	-
76%~100%	4	-	-	-	-

CD31-MVD 的结果判定: CD31 阳性染色呈棕黄色, 主要定位在癌及癌旁组织的血管内皮细胞, 部分表达于癌细胞。CD31-MVD 的判定标准: 参照 Weidner 校正方法^[4], 取 5 个视野的平均值为 CD31-MVD 值。

1.2.3 实时荧光定量 PCR 检测 MMP-14 mRNA 将组织在 EP 管中剪成 5 mm³ 的小块, 将 750 μl 的 TRIzol 加入 EP 管中, 用 TRIzol 法提取结肠癌组织及正常切缘组织的总 RNA。使用 NANO DROP2000 检测总 RNA 的浓度及光密度值。用反转录试剂盒反转录为 cDNA, 引物由上海生工设计合成 (表 3), 用 qRT-PCR 法检测 MMP-14 mRNA 的相对表达量。为消除样品量的差异, 引入内参基因 β -actin 进行校

正。记录 Ct 值 (基本循环数), 计算出 ΔCT 值, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 计算 MMP-14 的相对表达量。

表 3 引物设计

基因	引物序列
β -actin	F: 5'-GGACTTCGACGAAGAGATGG-3' R: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
MMP-14	F: 5'-ATCTGCCTCTGCCTCACCTA-3' R: 5'-AAGCCCCATCCAAGGCTAAC-3'

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行分析, 采用 χ^2 检验分析 MMP-14 与各个临床病理特征的关系, 用 t 检验比较各组间的关系, CD31-MVD 值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。MMP-14 和 CD31-MVD 值的相关性采用列联相关系数。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-14 蛋白在结直肠癌中的表达 MMP-14 在结直肠癌组织中主要在细胞质表达, 呈散在或团状分布。在少部分间质细胞中也有表达, 但表达强度弱于癌细胞 (图 1A)。MMP-14 在正常切缘组织中不表达或微弱表达 (图 1B)。实验组中 MMP-14 阳性表达率为 71.66% (43/60), 显著高于对照组 16.00% (4/20), 两组比较差异有统计学意义 ($\chi^2 = 16.533$, $P < 0.01$)。

2.2 MMP-14 蛋白表达与结直肠癌临床病理特征的关系 免疫组化实验结果显示, 结直肠癌组织中 MMP-14 的表达与肿瘤浸润深度、肿瘤大小、淋巴结有无转移以及 TNM 分期相关 ($P < 0.05$), 而与患者的年龄和性别无关。见表 4。

2.3 CD31 在结直肠癌中的表达 CD31 阳性细胞着色部位主要是血管内皮细胞的细胞膜和细胞质, 并且细胞膜着色比胞质重。CD31 染色的血管呈条索状或者具有明显的管腔, 在结肠癌组织中的微血管形态不规则, 分布不均, 在癌组织周围微血管密度较高, 呈簇状分布 (图 1C), MVD 值为 (32.56 $\pm$ 7.09), 而在正常切缘组织中 CD31 染色的微血管的形态比较规则, 分布也比较均匀 (图 1D), MVD 值为 (22.25 $\pm$ 5.41); 结直肠癌组织的 MVD 值明显高于正常切缘组织, 两组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。

2.4 CD31-MVD 与结直肠癌临床病理特征的关系 免疫组化实验结果显示, 结直肠癌组织中 CD31-MVD 值与肿瘤的瘤体大小、浸润深度、淋巴结有无转移、脉管内有无瘤栓、TNM 分期相关 ($P < 0.05$), 与患者的年龄和性别无关。见表 4。

表4 MMP-14、CD31 与肿瘤临床病理特征的关系

临床病理特征	n	MMP-14 表达(n)		χ^2 值	P 值	CD31 标记的 MVD ($\bar{x} \pm s$)	t 值	P 值
		+	-					
年龄(岁)								
≤55	18	14	4	0.47	0.492	32.27 ± 8.07	0.34	0.731
>55	42	29	13			32.59 ± 6.50		
性别								
男	35	26	9	0.28	0.594	31.62 ± 7.02	-1.53	0.123
女	25	17	8			34.44 ± 6.63		
瘤体大小(cm)								
≤3	11	4	7	8.26	0.004	27.81 ± 6.16	-2.57	0.013
>3	49	39	10			33.63 ± 6.90		
浸润深度								
肌层以内	16	9	7	6.26	0.012	28.93 ± 8.40	-2.49	0.016
肌层以外	44	38	6			33.88 ± 6.14		
淋巴结转移								
无	33	18	15	10.50	0.001	29.96 ± 6.28	-6.09	0.001
有	27	25	2			35.74 ± 6.20		
脉管内瘤栓								
无	50	34	16	1.98	0.159	31.40 ± 5.41	-5.06	0.000
有	10	9	1			40.40 ± 3.20		
TNM 分期								
I + II	30	16	14	9.93	0.002	28.70 ± 3.64	-7.32	0.000
III + IV	30	27	3			37.10 ± 5.11		

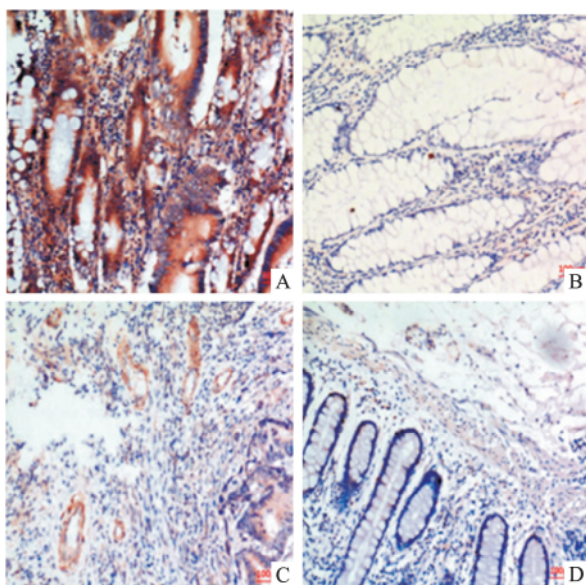


图1 MMP-14 和 CD31 在结直肠癌组织中表达上调 SP 染色 ×100

A: MMP-14 在结直肠癌组织表达; B: MMP-14 在正常切缘组织表达; C: CD31 在结直肠癌组织表达; D: CD31 在正常切缘组织表达

2.5 MMP-14 与 CD31 的相关性 在结直肠癌组织中, MMP-14 阳性表达组中 CD31-MVD 值为 (34.41 ± 5.82), MMP-14 阴性表达组中 CD31-MVD 值为 (27.88 ± 7.91), MMP-14 阳性表达组中的 CD31-MVD 值明显高于阴性组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

按照实验组 CD31-MVD 的均值 32.5 为分界,

将结直肠癌组分为 LCD31 (MVD < 32.5) 30 例, 以及 HCD31 (MVD > 32.5) 30 例。用列联相关系数分析 MMP-14 与 CD31-MVD 的相关性, 结果显示呈正相关性 ($r = 0.665$, $P < 0.01$)。

2.6 MMP-14 mRNA 的相对表达量 qRT-PCR 实验显示, MMP-14 mRNA 的相对表达量在结直肠癌组织中高于正常切缘组织, 两者差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。见表 5。

表5 MMP-14 mRNA 的相对表达量(n = 20)

项目	MMP-14 mRNA($\Delta\Delta CT$)	$2^{-\Delta\Delta CT}$	t 值	P 值
癌组织	15.33 ± 0.51	5.07	14.02	0.000
癌旁正常组织	17.74 ± 0.66	1.00		

3 讨论

肿瘤细胞的侵袭和转移与细胞基底膜和细胞外基质有着密不可分的关系。基底膜所形成屏障是肿瘤细胞发生侵袭所跨越的重要屏障之一。而 MMPs 可以降解 ECM, 从而提高了肿瘤细胞侵袭和转移的可能性。MMP-14 是一种膜型 MMPs, 其能够提高 ECM 结构蛋白的活性, 也可以激活其他的 MMPs。既可以降解 EMC 和基底膜, 也可以诱导肿瘤组织的血管生成, 为肿瘤细胞生长提供营养支持, 进而为肿瘤细胞进入循环系统转移提供了条件^[5]。很多实

验^[6-8]结果都证明,MMP-14在肿瘤组织中的高表达与肿瘤的发生、发展关系十分紧密。研究报道,MMP-14在结肠癌组织中高表达,并且其表达水平与肿瘤大小、Dukes分期及有无淋巴结转移有显著相关性。这与本次实验的结果是相一致的。此外本实验用qRT-PCR的方法检测了结直肠癌及正常切缘组织中MMP-14 mRNA相对表达量,结果也同样显示在结直肠癌组织中MMP-14 mRNA的相对表达量较正常切缘组织高,这与免疫组化的结果相一致,也进一步说明MMP-14在结直肠癌的发生和发展中起着某些促进作用。

新生的血管可以为肿瘤组织提供其生长所需的营养和氧,还可以提供大量的生长因子,瘤体就会不断生长,并很快发生远处转移。大量研究^[9-11]结果表明,恶性肿瘤内微血管的数量和密度与其侵袭和转移能力直接相关。CD31经过与血小板的结合,介导了肿瘤细胞与内皮细胞的黏附过程,使得两者黏附的更加牢固,促进了肿瘤组织内的血管生成,进而促进了肿瘤细胞的生长和侵袭^[12]。研究^[13]表明CD31在成熟和非成熟的肿瘤血管中均有表达,可以比其他内皮细胞标记因子更加准确地标记出肿瘤组织内微血管的数目和密度。本研究结果显示,结直肠癌组中CD31-MVD值明显高于正常切缘组织,且与结直肠癌组织的病理特征密切相关。肿瘤浸润深度深、有淋巴结转移以及TNM分期高的组中CD31-MVD值相对也较大,这也反映了肿瘤组织中血管的生成有助于肿瘤的生长、侵袭和转移。

肿瘤血管的形成过程中有大量的生物活性分子参与其中,MMPs就是其中一个重要的因子。新生血管在芽生过程中必须降解局部ECM成分,而MMPs在此过程中起到非常重要的作用^[14]。MMP-14不仅可以降解ECM,还可以通过调节VEGF的高表达来促进血管生成^[15]。本次实验中MMP-14阳性的结直肠癌组织中CD31-MVD值明显高于阴性组,也侧面反映出MMP-14有促进肿瘤组织血管成长的作用。同时也提示MMP-14和CD31-MVD两者在结直肠癌发生发展中有一定的相互关系。对MMP-14和CD31-MVD的深入研究有助于进一步揭示结直肠癌的发病机制,并为结直肠癌的诊治提供依据。此外,抑制肿瘤血管的生成已经成为一个新的抗肿瘤方法,目前也有一些合成的MMP抑制剂应用于临床试验,随着研究的不断深入将会有更加成熟的MMP抑制剂应用于临床,为肿瘤患者提供

更好的治疗方法。

参考文献

- [1] Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-32.
- [2] Gencer S, Cebeci A, Irmak-Yazicioglu M B. Matrix metal-loproteinase gene expressions might be oxidative stress targets in gastric cancer cell lines [J]. Chin J Cancer Res, 2013, 25(3): 322-33.
- [3] Tang D G, Chen Y Q, Newman P J, et al. Identification of PE-CAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium [J]. J Biol Chem, 1993, 268(30): 22883-94.
- [4] Weidner N. Intratumor microvessel density as a prognosis factor in cancer [J]. Am J Pathol, 1995, 147(1): 9-19.
- [5] 朱燕, 杨其昌, 刘宏斌, 等. 宫颈癌组织中CD146和MMP-14表达的意义及相关性分析 [J]. 实用癌症杂志, 2011, 26(1): 16-9.
- [6] Gong Y, Chippada-Venkata U D, Oh W K. Roles of matrix metal-loproteinases and their natural inhibitors in prostate cancer progression [J]. Cancers (Basel), 2004, 6(3): 1298-327.
- [7] Orgaz J L, Pandya P, Dalmeida R, et al. Diverse matrix metalloproteinase functions regulate cancer amoeboid migration [J]. Nat Commun, 2014, 5: 4255.
- [8] Roomi M W, Kalinovsky T, Niedzwiecki A, et al. Modulation of uPA, MMPs and their inhibitors by a novel nutrient mixture in human glioblastoma cell lines [J]. Int J Oncol, 2014, 45(2): 887-94.
- [9] 张永胜, 徐龙江, 李峰, 等. 胰腺癌组织中EGFR和CD31的表达及其临床意义 [J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(10): 1117-9.
- [10] 张丽静, 王圆圆, 李芳, 等. 结直肠癌发生过程中CD31与VEGF的表达 [J]. 中国现代医学杂志, 2011, 21(1): 1-4.
- [11] Li G C, Zhang Z, Ma X J, et al. Are biomarkers correlated with recurrence patterns in patients with resectable gastric adenocarcinoma [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1): 399-405.
- [12] 程继荣, 徐斌, 王淑琴, 等. 肺癌组织CD31、CD34及CD105标记的微血管密度的临床意义 [J]. 中国癌症杂志, 2010, 20(8): 638-40.
- [13] Sumpio B E, Yun S, Cordova A C, et al. MAPKs (ERK1/2, p38) and AKT can be phosphorylated by shear stress independently of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) in vascular endothelial cells [J]. J Biol Chem, 2005, 280(12): 11185-91.
- [14] Rigging K S, Mernaugh G, Su Y, et al. MT-MMP mediated basement membrane remodeling modulates renal development [J]. Exp Cell Res, 2010, 316(17): 2993-3005.
- [15] Zhang H, Wang Y, Xing F, et al. Over expression of LIMK1 promotes migration ability of multidrug-resistant osteosarcoma cell [J]. Oncol Res, 2011, 19(10-11): 501-9.

网络出版时间: 2017-9-8 12:37 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20170908.1237.026.html>

活体供肾移植后外周血 Treg、Th17 及 Th17/Treg 比值的变化研究

欧欣¹ 张茜¹ 刘洪涛² 徐飞¹ 程民³ 陈军¹ 徐晓玲¹

摘要 目的 检测活体肾移植受者外周血调节性 T 细胞 (Treg) 和辅助性 T 淋巴细胞 17 (Th17) 的比例, 探寻肾移植术后外周血 Treg 细胞、Th17 细胞及 Th17/Treg 比值的动态变化规律。方法 采用前瞻性研究方法, 用流式细胞术分别检测活体肾移植受者术前和术后 1、2、3 周及术后 1、2、3、4、5、6 个月的外周血 Treg 细胞、Th17 细胞比例。结果 Treg 细胞比例在术后第 2 周明显下降 ($P < 0.05$), 术后 2 个月降至最低, 较术前相比下降 68.6% ($P < 0.05$), 术后 6 个月恢复至术前水平。Th17 细胞比例在术后 1 周至 3 周明显升高 ($P < 0.05$), 术后 1 个月恢复至术前水平。移植后第 1 周

Th17/Treg 细胞比值明显升高 ($P < 0.05$), 持续至术后 3 个月, 术后 6 个月恢复至术前水平。术后使用环孢素的受者 Treg 细胞比例在术后 2 个月最低, 下降 67.1% ($P < 0.05$); 术后使用他克莫司的受者 Treg 细胞比例在术后 3 周最低, 下降 80.8% ($P < 0.05$), 均在术后 3 个月开始缓慢上升。CD3⁺T 细胞比例在术后 1 周降低 ($P < 0.05$), 术后 3 周恢复至术前水平。结论 活体肾移植术后免疫细胞处于动态变化。术后 2 周到 5 个月 Treg 细胞比例均明显降低, 其中以术后 2 个月最低。Th17/Treg 细胞比值在术后 1 周到 3 个月均明显升高。他克莫司和环孢素对肾移植术后 Treg 细胞都有抑制作用。

关键词 肾移植; 调节性 T 细胞; Th17 细胞

中图分类号 R 699.2

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2017)11-1698-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.11.026

2017-06-13 接收

基金项目 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH216)

作者单位 安徽医科大学附属省立医院¹ 呼吸内科、² 器官移植病房、³ 肿瘤免疫与营养治疗安徽省重点实验室, 合肥 230001

作者简介 欧欣, 女, 硕士研究生;

徐晓玲, 女, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: xxlahh08@163.com

活体肾移植术无疑已经成为终末期肾脏疾病的最有效治疗策略, 免疫抑制剂的使用进一步提高了

Expression of MMP-14 and CD31-MVD in colorectal carcinoma and its clinical significance

Ma Jinjiang¹, Li Zhigang², Hou Jixue² et al

(¹School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832002; ²Dept of Gastrointestinal and Breast Surgery, The First Affiliated Hospital of School of Medicine of Shihezi University, Shihezi 832002)

Abstract Objective To investigate the expression of matrix metalloproteinase-14 (MMP-14) and CD31-MVD in colorectal carcinoma and their clinical significance. **Methods** The expression of MMP-14 and CD31-MVD were detected by immunohistochemistry in 60 cases of colorectal carcinoma and 20 cases of normal tissues from resection margin. The expression of MMP-14 mRNA were detected by qRT-PCR in 20 cases of fresh colorectal carcinoma tissues and normal tissues from resection margin. **Results** ① The expression of MMP-14 and CD31-MVD in colorectal carcinoma tissues were significantly higher than those in the normal tissues from resection margin ($P < 0.05$). ② The expression of MMP-14 and CD31-MVD were correlated with tumor size, depth of invasion, TNM stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but there was no significant correlation with gender and age of patients. ③ The expression of MMP-14 was positively correlated with CD31-MVD. ④ The expression of MMP-14 mRNA in colorectal carcinoma were significantly higher than that in the normal tissues from resection margin ($P < 0.01$). **Conclusion** The high expression of MMP-14 and CD31-MVD in colorectal carcinoma were closely related to the occurrence, invasion and metastasis of colorectal cancer.

Key words colorectal cancer; MMP-14; CD31-MVD; immunohistochemistry; qRT-PCR