

胃癌血清和组织中 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 的表达情况及临床意义

葛尔树¹, 刘 弋²

摘要 目的 检测 Her-2/neu、基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和瘦素 (Leptin) 在胃癌血清和组织中表达情况, 探讨它们在胃癌发生、发展过程中的作用。方法 分别应用 ELISA 和免疫组化 (IHC) 法检测胃癌血清和组织中 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 表达情况。结果 Her-2/neu、MMP-2、Leptin 在胃癌血清中阳性表达率明显高于在正常对照组中阳性表达率 ($P < 0.05$); Her-2/neu、MMP-2、Leptin 在胃癌组织中阳性表达率明显高于在癌旁组织中阳性表达率 ($P < 0.05$)。Her-2/neu、MMP-2、Leptin 在胃癌血清和癌组织中阳性表达率具有一致性。Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 在胃癌组织中的阳性表达均与浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期显著相关 ($P < 0.05$), 与患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位和肿瘤分化程度均无相关性。Her-2/neu 在血清中表达与浸润深度、淋巴结转移和 TNM 分期呈显著正相关 ($P < 0.05$); MMP-2 在血清中表达与淋巴结转移呈正相关 ($P < 0.05$); Leptin 在血清中表达与病理特征无明显相关性。结论 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 在胃癌的发生、发展和转移过程中起促进作用, 针对 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 的检测可用于临床诊断, 指导靶向治疗, 并为临床预后提供科学合理参考。

关键词 胃肿瘤; Her-2/neu; 基质金属蛋白酶-2; 瘦素

中图分类号 R 735.2

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)01-0076-05

胃癌具有侵袭性的生物学特点, 容易侵犯周围组织器官, 影响相应脏器功能, 早期就有发生淋巴转移的可能, 目前病因还不十分明确。传统胃镜检查只能确诊, 不能进行临床分期及评估。临床上对胃癌检测缺乏特异性和敏感性的血清学指标。随着分子生物学的发展和对肿瘤发病机制的细胞、分子水平认识, 基因检测和分子靶向治疗是肿瘤研究的未来方向。寻找出特异性基因, 用于临床检测和靶点治疗已成为胃癌研究的方向。该研究分别采用酶联免疫吸附试验 (ELISA)、免疫组化 (IHC) 法测定胃

癌血清、组织中 Her-2/neu、基质金属蛋白酶-2 (matrix metalloproteinases-2, MMP-2) 和瘦素 (Leptin) 的表达水平, 探讨它们在胃癌发生、发展过程中的作用, 寻找更加敏感的血清学指标用于临床诊断, 指导靶向治疗, 并为临床预后提供科学合理的参考。

1 材料与方法

1.1 研究对象 选取安徽医科大学第一附属医院普通外科 2010 年 3 月 ~ 2011 年 5 月, 行手术切除患者 80 例, 术后经病理证实为胃癌的存档石蜡块作为实验组; 术中收取同一新鲜标本距肿瘤 5 cm 以上肉眼观察正常的癌旁组织作为对照组 (所有癌旁组织经病理检查未见肿瘤细胞浸润)。同样取患者术前血清作实验组, 再随机选取本院体检中心经各项检查结果 20 份正常血清作对照组。

所有病例均系原发, 术前未接受放化疗治疗, 配对资料完整。其中男 60 例, 女 20 例, 年龄 25 ~ 82 岁, 平均 61.2 岁。肿瘤位于贲门胃底部有 41 例, 胃体部 20 例, 胃窦部 19 例。肿瘤直径最小约 0.8 cm, 最大直径约 13 cm (其中 < 5 cm 者有 42 例, ≥ 5 cm 者 38 例)。有淋巴结转移者 49 例, 无淋巴结转移者 31 例。有远处转移者 5 例。肿瘤侵犯黏膜层及黏膜下层者 11 例, 侵犯至肌层或浆膜下层者 11 例, 肿瘤侵犯至浆膜层者 46 例, 穿透浆膜侵犯邻近结构或器官者 12 例。所有病例病理提示为腺癌, 其中属肿瘤细胞高分化者 6 例, 中分化者 30 例, 低分化者 44 例。参照美国国家综合癌症网络 (NCCN) 标准, 临床分期 I 期 15 例, II 期 19 例, III 期 40 例, IV 期 6 例。

1.2 主要试剂 即用型肿瘤蛋白 P185erbB-2/HER-2 单克隆兔抗试剂盒、Leptin 蛋白单克隆兔抗试剂盒、MMP-2 蛋白单克隆兔抗试剂及血清肿瘤蛋白 p185BA-ELISA 诊断试剂、血清瘦素检测试剂盒 (ELISA 法)、血清 MMP-2 检测试剂盒由安徽安科生物股份有限公司提供。

1.3 实验方法

1.3.1 检测方法 分别采用 ELISA、IHC 法测定胃癌血清、组织中 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 的表达

2013-08-26 接收

基金项目: 安徽省临床医学重点学科应用技术创新计划 (编号: 05A036)

作者单位: ¹ 马鞍山市人民医院普通外科, 马鞍山 243000

² 安徽医科大学第一附属医院普通外科, 合肥 230022

作者简介: 葛尔树, 男, 硕士, 主治医师, 责任作者, E-mail: g. es@163.com

水平。

1.3.2 结果判断

1.3.2.1 组织中判断 将细胞膜或胞质出现棕黄色颗粒定义为阳性细胞,每张切片随机选取10个高倍(400×)视野,每个视野数100个细胞,共计1000个细胞。参照Her-2/neu和Leptin试剂盒说明书,将组织或细胞片无着色,或5%以下的癌细胞膜染色成黄色,染色弱者定义为阴性;将>5%定义的细胞出现细胞膜被染成棕黄色,且染色连续并环绕整个细胞膜的为阳性。MMP-2判断结果参照说明书进行,将阳性细胞数≤10%定义为阴性,>10%定义为阳性。

1.3.2.2 血清中判断 ELISA法定量检测,经分光光度仪扫描(450 nm),得出每孔的吸光度(A)值,根据标准品浓度与A值绘出标准曲线,即可得出每孔血清Her-2/neu、MMP-2和Leptin的浓度。参照试剂盒说明书,血清Her-2/neu浓度≥0.5 μg/ml为阳性,<0.5 μg/ml为阴性。MMP-2浓度≥5.0 ng/ml为阳性,<5.0 ng/ml为阴性。Leptin浓度≥0.2 ng/ml为阳性,<0.2 ng/ml为阴性。

1.4 统计学处理 采用SPSS 17.0软件进行分析。计量数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两样本均数比较采用 t 检验,多样本均数比较采用单因素方差分析。一般率的比较采用 χ^2 检验。三者间的相关性采用Spearman等级相关分析。

2 结果

2.1 Her-2/neu、MMP-2和Leptin蛋白在胃癌血清和组织中的表达 血清试验组($n=80$)中Her-2/neu、MMP-2和Leptin阳性表达率分别为25%(20/80)、60%(48/80)、57.5%(46/80),血清对照组中Her-2/neu未见表达,MMP-2和Leptin在癌旁组织中的表达分别为20%(4/20)、30%(6/20),两组比较差异有统计学意义($P<0.05$);在胃癌组织中Her-2/neu、MMP-2和Leptin阳性表达率分别为30%(24/80)、62.5%(50/80)、70%(56/80),见表1、2;Her-2/neu在癌旁组织中未见表达,MMP-2和Leptin在癌旁组织中的表达分别为37.5%、35%,两组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。标本染色阳性、阴性表达见图1。

2.2 Her-2/neu、MMP-2和Leptin蛋白在胃癌组织和血清中的表达有一致性 在胃癌组织与血清两组比较中Her-2/neu、MMP-2和Leptin阳性率均无明显差异,阳性表达具有一致性。通过2×2配对资

料的关联性分析,说明在血清与组织中Her-2/neu、MMP-2和Leptin蛋白的表达存在关联,具有较好的一致性,见表1。

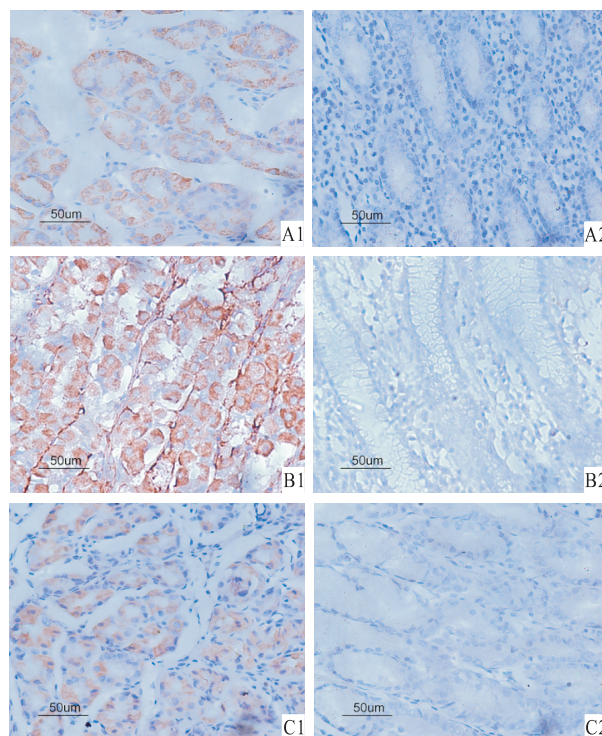


图1 各蛋白在胃癌中的表达 SP×400

A: Her-2/neu; B: MMP-2; C: Leptin; 1: 阳性表达; 2: 阴性表达

2.3 Her-2/neu、MMP-2和Leptin蛋白表达与胃癌临床病理特征的关系 血清中Her-2/neu的阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和TNM分期呈显著正相关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位和肿瘤分化程度无相关性;血清中MMP-2的阳性表达与淋巴结转移呈正相关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位、浸润深度、肿瘤分化程度和TNM分期无相关性;血清中Leptin蛋白表达与临床病理特征无相关性。组织中Her-2/neu、MMP-2和Leptin的阳性表达与肿瘤浸润深度、淋巴结转移和TNM分期呈显著正相关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤部位和肿瘤分化无相关性。

2.4 血清中Her-2/neu、MMP-2和Leptin之间阳性表达 胃癌血清中Her-2/neu和MMP-2之间的表达呈正相关($r=0.236, P<0.05$),Her-2/neu、MMP-2与Leptin之间的表达无相关性。胃癌组织中Her-2/neu、MMP-2和Leptin之间的表达呈正相关($r=0.338, 0.429, 0.451, P<0.05$),见表3~6。

表1 胃癌血清中 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 的表达与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

项目	n	Her-2/neu	P 值	MMP-2	P 值	Leptin	P 值
血清对照组	20	0.153 1 ± 0.033 3	0	5.5798 ± 0.897 4	0.008	0.226 7 ± 0.076 8	0.043
血清实验组	80	0.392 6 ± 0.211 6		6.6737 ± 1.751 1		0.313 5 ± 0.184 9	
性别							
男	60	0.412 5 ± 0.217 6	0.146	6.607 6 ± 1.74 84	0.562	0.305 6 ± 0.197 4	0.509
女	20	0.332 9 ± 0.184 9		6.8723 ± 1.789 4		0.337 4 ± 0.142 8	
年龄(岁)							
<60	34	0.351 3 ± 0.211 9	0.135	6.851 6 ± 1.813 8	0.438	0.350 4 ± 0.132 3	0.126
≥60	46	0.423 1 ± 0.208 4		6.542 4 ± 1.711 5		0.286 3 ± 0.213 1	
肿瘤部位							
贲门胃底	41	0.358 6 ± 0.203 9	0.366	6.763 9 ± 1.809 4	0.813	0.293 8 ± 0.223 2	0.610
胃体	20	0.410 4 ± 0.218 7		6.551 7 ± 1.841 6		0.331 8 ± 0.123 1	
胃窦	19	0.447 2 ± 0.217 9		6.607 8 ± 1.600 8		0.337 0 ± 0.146 7	
肿瘤大小(cm)							
<5	42	0.3606 ± 0.201 8	0.156	6.5575 ± 1.713 7	0.536	0.291 3 ± 0.221 1	0.261
≥5	38	0.4280 ± 0.219 1		6.8022 ± 1.805 6		0.338 1 ± 0.133 0	
浸润深度							
T1 ~ T2	22	0.269 1 ± 0.132 8	0.001	6.486 8 ± 1.783 4	0.560	0.347 1 ± 0.148 7	0.320
T3 ~ T4	58	0.439 5 ± 0.217 8		6.744 7 ± 1.749 1		0.300 8 ± 0.196 6	
分化程度							
高	6	0.322 3 ± 0.132 1	0.300	6.852 8 ± 1.886 0	0.835	0.254 2 ± 0.091 6	0.424
中	30	0.457 4 ± 0.232 1		6.661 6 ± 1.704 5		0.336 6 ± 0.157 1	
低	44	0.358 0 ± 0.197 6		6.657 7 ± 1.804 3		0.305 9 ± 0.210 4	
淋巴结转移							
有	49	0.481 8 ± 0.208 4	0.000	7.067 8 ± 1.837 2	0.011	0.286 7 ± 0.206 4	0.103
无	31	0.251 6 ± 0.121 9		6.051 2 ± 1.421 4		0.356 0 ± 0.137 3	
TNM 分期							
I + II	34	0.244 3 ± 0.118 7	0.000	6.351 2 ± 1.675 6	0.158	0.350 4 ± 0.132 3	0.126
III + IV	46	0.502 2 ± 0.198 4		6.912 2 ± 1.785 3		0.286 3 ± 0.213 1	

3 讨论

胃癌是一个多因素、多步骤、多阶段发展过程。研究^[1-2]证实:基因 Her-2/neu 处于非激活状态,当受到致癌因素作用后,其表达失控被激活,促使肿瘤增殖和浸润、促进新生肿瘤血管形成、抑制细胞凋亡及机体免疫反应,使细胞发生恶性转化。有报道 Her-2 过表达是胃癌预后不良因素^[3]。本研究显示,随着肿瘤侵犯黏膜下层、肌层及穿透浆膜层的发展,Her-2 阳性表达水平也逐步提高,且与有淋巴结转移、TNM 分期增加明显呈正相关,临床预后越不理想。对 Her-2 的检测可及时有效地反映肿瘤的发生、发展情况,特别是在对胃癌术前分期的判断上能提高其准确率,为临床治疗提供合理方案,避免盲目开腹,并可指导胃癌的靶向治疗。

对 Her-2/neu 血清学检测具有简单、可重复性优点,它可作为组织学检测的补充,特别是对于胃癌术前临床分期的判断及监测肿瘤术后复发方面有重要意义。随着对 Her-2/neu 致癌机制的深入研究,

相信其血清学检测会在更多的肿瘤诊断与治疗中应用,甚至可用于胃癌的临床普查。

MMP-2 是一种肽链内切酶,具有很强的水解Ⅳ型胶原能力,有利于肿瘤细胞的浸润和远处转移。研究^[4]显示,MMP-2 在胃癌组织中阳性表达率明显增高,其阳性多分布在癌细胞与基质交界处,表明与胃癌的浸润深度、淋巴结转移呈正相关^[5-6]。本研究显示,MMP-2 在血清和组织中阳性表达具有完全一致性,随着肿瘤侵犯黏膜及黏膜下层、肌层、浆膜层的发展,MMP-2 的阳性表达水平也逐步提高,且与肿瘤淋巴结转移、TNM 分期增加明显相关。对 MMP-2 的检测可及时有效地反映肿瘤的发生、发展情况,特别是在对胃癌术前分期的判断和淋巴结有无转移判断上能提高其准确率。本研究显示:MMP-2 血清学检测能提高胃癌术前临床分期的判断,可作为胃癌淋巴结转移的独立因子用于临床指导。

Leptin 具有生长因子作用,可促进细胞增殖。本研究显示:Leptin 在胃癌组织的表达浸及浆膜组明显高于未及浆膜组,淋巴结转移组明显高于未转

表2 胃癌组织中 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 的表达与临床病理特征的关系(n)

病理特征	n	Her-2/neu		χ^2 值	P 值	MMP-2		χ^2 值	P 值	Leptin		χ^2 值	P 值
		-	+			-	+			-	+		
癌旁组织	80	80	0	28.24	0	50	30	10.00	0.002	52	28	19.65	0
胃癌组织	80	56	24			30	50			24	56		
性别													
男	60	40	20	1.27	0.260	22	38	0.07	0.790	16	44	1.27	0.260
女	20	16	4			8	12			8	12		
年龄(岁)													
<60	34	26	8	1.18	0.278	12	22	0.12	0.726	13	21	1.91	0.167
≥60	46	30	16			18	28			11	35		
肿瘤部位													
贲门胃底	41	28	13	0.18	0.914	18	23	2.05	0.358	14	27	0.70	0.706
胃体	20	14	6			5	15			5	15		
胃窦	19	14	5			7	12			5	14		
肿瘤大小(cm)													
<5	42	28	14	0.47	0.494	13	29	1.62	0.203	11	31	0.61	0.434
≥5	38	28	10			17	21			13	25		
浸润深度													
T1 ~ T2	22	20	2	6.32	0.012	13	9	6.04	0.014	12	10	8.71	0.003
T3 ~ T4	58	36	22			17	41			12	46		
分化程度													
高	6	4	2	0.26	0.878	4	2	3.80	0.149	3	3	1.85	0.397
中	30	22	8			13	17			7	23		
低	44	30	14			13	31			14	30		
淋巴结转移													
有	49	30	19	4.64	0.031	13	36	6.49	0.011	9	40	8.15	0.004
无	31	26	5			17	14			15	16		
TNM 分期													
I + II	34	28	6	4.30	0.038	18	16	6.02	0.014	15	19	5.61	0.018
III + IV	46	28	18			12	34			9	37		

表3 血清中 Her-2/neu 与 MMP-2、Leptin 表达的相关性(n)

Her-2/ neu	MMP-2		χ^2 值	P 值	r 值	Leptin		χ^2 值	P 值	r 值
	+	-				+	-			
+	16	4	4.444	0.035	0.236	15	5	3.342	0.068	0.204
-	32	28				31	29			

表4 血清中 Leptin 和 MMP-2 表达的相关性(n)

Leptin	MMP-2		χ^2 值	P 值	r 值
	+	-			
+	31	15	2.363	0.116	0.175
-	17	17			

表5 组织中 Leptin 和 MMP-2 表达的相关性(n)

Leptin	MMP-2		χ^2 值	P 值	r 值
	+	-			
+	43	13	16.25	0.001	0.451
-	7	17			

表6 组织中 Her-2/neu 与 MMP-2、Leptin 表达的相关性

Her-2/ neu	MMP-2		χ^2 值	P 值	r 值	Leptin		χ^2 值	P 值	r 值
	+	-				+	-			
+	21	3	9.143	0.002	0.338	24	0	14.69	0.001	0.429
-	29	27				32	24			

移组,临床分期越高 Leptin 的表达率越明显。随着胃癌细胞浸润程度的增加,Leptin 在组织中的阳性表达率也逐步增高,这时 Leptin 的保护性调节机制被打破,其促生长因子功能被持续放大,作用时间持久,促使肿瘤细胞快速、无限增殖。对 Leptin 的检测可及时有效地反映肿瘤的发生、发展情况,对胃癌预后评估提供参考。

Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 三者相互关系在胃癌中未见研究,仅见乳腺癌中有两两相关报道^[7-9]。Leptin 上调 Her-2 的表达,降低抗 Her-2 治疗的敏感性。Leptin 也可通过某种信号通路上调 MMP-2 表达,抑制 TIMP 的作用,促进癌细胞的浸润、转移。HER-2 可通过 Ras/MAPK 途径使转录因子 ER81 磷酸化,活化的 ER81 则直接与 MMP-2 启动子区结合而促进其转录。实验显示,Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 三者在胃癌组织中同时阳性表达率占 26.3% (21/80),同时阴性表达率为 21.3% (17/80),Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 中二者阳性率达 52.5% (42/80),三者之间存在正相关性,它们相互之间可

能存在某种正反馈机制,不断促进肿瘤的生长、浸润和转移。其作用形式及复杂的相互关联需进一步研究。

胃癌早期缺乏特异性血清检测,针对 Her-2/neu、MMP-2 和 Leptin 血清学检测具有简便、可重复性优势,在未来的研究中可作为肿瘤术前筛查,并指导预后及后续治疗。

参考文献

- [1] Semba K, Kamata N, Toyoshima K, et al. A V-erbB-related proto-oncogene, c-erbB-2, is distinct from the c-erbB-1/epidermal growth factor-receptor gene and is amplified in a human salivary gland adenocarcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(19): 6497 - 501.
- [2] Lordick F, Leong-Chong J, Kang Y, et al. Her2 status of advanced gastric cancer is similar in Europe and Asia[J]. *Ann Oncol* 2007, 18(Suppl 7): 253.
- [3] Hang X L, Yang Y S, Xu D P, et al. Comparative study on overex-

pression of HER2/neu and HER3 in gastric cancer[J]. *World J Surg* 2009, 33(10): 2112 - 8.

- [4] 吴倩, 张红, 张和平. 组织芯片技术研究 CD147 和 MMP-2 在胃癌中的表达[J]. *安徽医科大学学报*, 2010, 45(1): 43 - 6.
- [5] 陈美芳, 季峰, 厉有名. 食管癌基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达的研究[J]. *中华消化杂志* 2002, 22(3): 181 - 2.
- [6] Monig S P, Baldus S E, Henneken J K, et al. Expression of MMP-2 is associated with progression and lymph node metastasis of gastric carcinoma[J]. *Histopathology*, 2001, 39(6): 597 - 602.
- [7] Ke Z, Lin H, Fan Z, et al. MMP-2 mediates ethanol-induced invasion of mammary epithelial cells over-expressing ErbB2[J]. *Int J Cancer* 2006, 119(1): 8 - 16.
- [8] Surmaez E, Fiorio E, Mercanti A. Leptin/HER-2 crosstalk in breast cancer: *in vitro* study and preliminary *in vivo* analysis[J]. *BMC Cancer* 2008, 8: 305.
- [9] Van Hul M, Lijnen H R. Matrix metalloproteinase inhibition impairs murine adipose tissue development independently of leptin[J]. *Endocr J* 2011, 58(2): 101 - 7.

Expression and clinical significance of Her-2/neu, MMP-2 and Leptin in serum and tumor tissue of gastric carcinoma

Ge Ershu¹, Liu Yi²

(¹Dept of General Surgery, Municipal People's Hospital of Ma'anshan, Ma'anshan 243000;

²Dept of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022)

Abstract **Objective** Detected Her-2/neu, matrix metalloproteinases-2 (MMP-2) and Leptin in stomach cancer serum and tissue, discussed their roles in occurrence and development of gastric cancer. **Methods** Detected the expression of Her-2/neu, MMP-2 and Leptin in serum by ELISA, and detected the expression of Her-2/neu, MMP-2 and Leptin in stomach cancer tissue by IHC. **Results** The positive rates of Her-2/neu, MMP-2, Leptin in gastric cancer serum were higher than the positive rates in control group ($P < 0.05$). The positive rates of Her-2/neu, MMP-2, Leptin in gastric cancer tissues were higher than the positive rates in adjacent tissues ($P < 0.05$). The positive expressions of two tests had consistency. In tissues, the positive expression rates of Her-2/neu, MMP-2 and Leptin were correlated with the depth of invasion, lymph node metastasis, clinical stage ($P < 0.05$). Their expression was not correlated with sex, age, size, site of tumor and the degree of differentiation. In serum, the positive expression of Her-2/neu was correlated with the depth of invasion, lymph node metastasis, clinical stage ($P < 0.05$). The positive expression of MMP-2 was correlated with lymph node metastasis ($P < 0.05$). The positive expression of Leptin had no significant correlation with pathological features. **Conclusion** Her-2/neu, MMP-2 and Leptin promote the occurrence, development and transfer process of gastric cancer. It can be used for clinical diagnosis, guide the targeted therapy and provide scientific and reasonable reference for gastric cancer prognosis.

Key words gastric carcinoma; Her-2/neu; MMP-2; Leptin