

## · 论 著 ·

## E-钙粘蛋白和 MMP-9 在胃癌组织中的表达及其临床意义

徐桂芳<sup>1</sup>, 张建东<sup>2</sup>, 赵海滨<sup>2</sup>, 吴国忠<sup>2</sup>, 郑 扬<sup>2</sup>, 张伟杰<sup>2</sup>

**[摘要]** 目的 研究 E-钙粘蛋白(E-Cadherin, E-Cad)和基质金属蛋白酶 9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在胃癌中的表达,及其与胃癌临床病理特征、淋巴结转移和患者预后之间的关系。方法 应用免疫组织化学方法,检测正常胃粘膜和胃癌标本的 E-Cad 和 MMP-9 表达。结果 在胃癌组织中, E-Cad 呈低表达,阳性表达率为 53.7%,明显低于正常胃粘膜组织( $P < 0.05$ ),其表达率与肿瘤大小、肿瘤分化、TNM 分期显著相关( $P < 0.05$ ),但与淋巴结转移无明显相关性( $P > 0.05$ ); E-Cad 表达阳性者,其 5 年生存期率较高( $P < 0.05$ )。MMP-9 在胃癌组织中呈高表达(75.0%),明显高于正常组织,且与淋巴结转移、肿瘤大小、肿瘤分化、分期以及生存期显著相关( $P < 0.05$ )。结论 胃癌广泛存在 E-钙粘蛋白及 MMP-9 表达异常,且与预后密切相关。

**[关键词]** 胃癌; E-钙粘蛋白; 基质金属蛋白酶 9; 淋巴结转移; 预后

中图分类号: R735.2 文献标志码: A 文章编号: 1672-271X(2010)04-0308-05

### Expression and significance of E-Cadherin and matrix metalloproteinase-9 in gastric carcinoma

XU Gui-fang<sup>1</sup>, ZHANG Jian-dong<sup>2</sup>, ZHAO Hai-bin<sup>2</sup>, WU Guo-zhong<sup>2</sup>, ZHENG Yang<sup>2</sup>, ZHANG Wei-jie<sup>2</sup>.

1. Department of Gastroenterology, Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing, Jiangsu 210008, China; 2. 101 Hospital of PLA, Wuxi, Jiangsu 214044, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expression of E-Cadherin (E-Cad) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in gastric cancer and their relationship with clinical pathological parameters, lymph metastasis and prognosis. **Methods** The expressions of E-Cad and MMP-9 proteins were detected by immunohistochemistry. **Results** E-Cad expression was low in gastric cancer tissue compared with normal gastric mucosa. The positive expression rate was 53.7% which was significantly lower than normal gastric mucosa ( $P < 0.05$ ). Its expression correlated with tumor size, tumor differentiation, and TNM stage ( $P < 0.05$ ), but no significant correlation with lymph node metastasis was found ( $P > 0.05$ ). The 5-year survival in patients with positive E-Cad expression was significantly longer than those with negative expression ( $P < 0.05$ ). MMP-9 in gastric cancer tissues showed significantly higher expression (75.0%) than in normal tissue ( $P < 0.05$ ). Its expression was related to lymph node metastasis, tumor size, tumor differentiation, TNM stage and survival ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** The expression of E-Cad and MMP-9 is related to prognosis of gastric carcinoma.

**[Key words]** gastric carcinoma; E-Cadherin; matrix metalloproteinase-9; lymph node metastasis; prognosis

肿瘤转移是一个复杂的、多步骤的连续过程:包括肿瘤细胞黏附于基质蛋白水解酶降解基质肿瘤细胞移动过程,其中细胞黏附是一个重要环节。细胞

间黏附作用在包括胚胎形成、细胞极性的维持、细胞的生长分化以及癌变过程中担当重要角色。

E-钙粘蛋白(E-Cadherin, E-Cad)是一个相对分子量为 120kd 的钙依赖性细胞黏附分子,定位于细胞间彼此连接的细胞膜处,跨越细胞膜全层。E-Cad 是介导上皮细胞间黏附的跨膜糖蛋白,在上皮细胞中均有表达,在细胞外钙离子参与下介导同种亲性和细胞间的黏附。基质金属蛋白酶(Matrix metallo-

作者简介: 徐桂芳(1977-),女,河北阳原人,博士,医师,从事消化系疾病临床工作

作者单位: 1. 210008 江苏南京,南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科; 2. 214044 江苏无锡,解放军 101 医院

proteinase 9, MMP-9) 是一种与肿瘤转移密切相关的物质,在肿瘤的血管化、肿瘤细胞的浸润和转移中发挥了重要作用。本研究旨在探讨 E-Cadherin 和 MMP-9 与胃癌淋巴结转移以及临床病理学的表达,以探讨其与肿瘤转移及预后之间的关系。

## 1 资料与方法

**1.1 研究对象** 1999 年 5 月至 2004 年 6 月在我院行手术切除胃癌患者 108 例,收集其病理切除的石蜡块标本。将标本分两组:胃癌伴淋巴结转移阳性组 54 例,胃癌伴区域淋巴结转移阴性组 54 例。所有患者术前均未行放化疗,2 例患者同时伴有肝脏转移。记录两组患者之间年龄、肿瘤大小、组织学类型、血管累及、远处转移和浆膜浸润与否。患者术后均接受随访,全组随访时间 5 ~ 120 个月,中位随访时间 50 个月。病理诊断与分类依据国际抗癌联合会 (Union Internationale Contrele Cancer, UICC) 的胃癌 TNM 临床分类。另外,取正常胃粘膜 20 例,作为对照组。所有组织学诊断均基于经常规处理后,苏木精和伊红染色的形态学检查。在无菌条件下,收集胃癌患者的新鲜手术标本及在被切除远端切取的正常胃粘膜组织。切取病理组织浸泡在 10% 甲醛中,并石蜡包埋。然后这些标本用于进行免疫组织化学染色。

**1.2 免疫组织化学染色** 采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶连结法 (SP 法)。鼠抗人 E-Cad 抗体、MMP-9 抗体 (购自上海太阳生物有限公司),按说明书操作。常规石蜡切片 2  $\mu\text{m}$ ,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化。CBS 电饭煲内煮沸 10 分钟,放置冷水内冷却 10 分钟。取出切片,用蒸馏水冲洗,再用 PH7.2 PBS (磷酸缓冲液) 0.01 mol 冲洗 3 次,并将切片上组织周围擦干。将切片置于孵育盒中,滴加一抗 50  $\mu\text{l}$ ,冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$  过夜。取出切片,用 PBS 冲洗 2 ~ 3 次,将切片周围擦干。将切片置于孵育盒中,滴加二抗 SuperPicTure Kit (Zymed 公司, USA) 50  $\mu\text{l}$ ,室温孵育 20 分钟。取出切片,用 PBS 冲洗 2 ~ 3 次,并将切片上组织周围擦干。DAB 显色 5 分钟。苏木素复染,脱水,透明,封片。以 PBS 替代一抗行阴性对照。切片由两个的经验丰富病理医师来分别独立评定,且这两个病理医师均不被告知标本性质及所用抗体。

**1.3 结果判定标准** 采用双盲法,根据染色程度和染色细胞百分率进行综合评分:AB 值法判定。A:按显色比例评分。显色细胞占实质细胞总数的 1/3 以下为 1 分,1/3 ~ 2/3 阳性显色细胞为 2 分,2/3

以上阳性显色细胞为 3 分。B:按切片中细胞显色评分。0 分为无着色,1 分浅黄色,2 分棕黄色,3 分棕褐色。AB 值法积分:阴性 (-):0 分;弱阳性 (+):1 ~ 3 分;阳性 (++) :4 ~ 6 分;强阳性 (+++) :大于 6 分。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS10.0 统计软件进行,计量资料用均数  $\pm$  标准差表示,进行  $t$  检验和单向方差分析 (One-Way ANOVA) 检验;计数资料用  $R \times C$  列表  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 临床病理资料** 同淋巴结转移阴性组患者相比,淋巴结转移阳性组患者肿瘤较大,组织分化较差,浸润度较深,Lauren 分型以弥漫型、混合型多见,且临床分期多为进展期 (III-IV),两者之间有明显差异 ( $P < 0.05$ ),但两者年龄、性别、肿瘤位置、组织病理类型以及肿瘤肉眼分型之间无明显差异。

**2.2 E-Cad 和 MMP-9 在胃癌和正常胃粘膜组织中的表达和分布** E-Cad 蛋白经免疫染色后,阳性反应呈现浅棕色至深棕色,在正常胃粘膜定位于细胞膜,呈现网格状阳性,在肿瘤组织中呈现不同程度的异常表达,MMP-9 的阳性染色均为棕黄色,分布相似,主要位于肿瘤细胞的胞浆,呈散在、片状或灶性分布 (图 1 ~ 4)。在胃癌患者中,E-Cad 和 MMP-9 阳性表达率分别为:53.7% (58/108) 和 75.0% (81/108)。在正常胃粘膜 E-Cad 和 MMP-9 阳性表达率分别为 90% (18/20) 和 10% (2/20)。同正常胃粘膜组比较,胃癌 E-Cad 和 MMP-9 阳性表达率差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。

**2.3 E-Cad、MMP-9 表达与胃癌临床病理特点之间的关系** E-Cad 表达与肿瘤大小、组织分化、浸润深度、组织病理类型和 TNM 分期密切相关 ( $P < 0.05$ ),但与患者性别、年龄、淋巴结转移与否均无明显相关。E-Cad 在未分化癌的阳性表达率为 12.5% (1/8),明显低于管状腺癌 60% (48/80)、粘液腺癌 50% (3/6) 及印戒细胞癌 42.9% (6/14),具有显著差异 ( $P < 0.05$ );根据 Lauren 分型,胃癌可分为肠型 (分化好)、弥漫型 (分化差)、混合型。结果显示,弥漫型 E-Cad 表达明显低于肠型 ( $P < 0.01$ )。MMP-9 表达除同淋巴结转移组相关外 ( $P < 0.05$ ),还与肿瘤大小和 TNM 分期密切相关 ( $P < 0.05$ ),但与性别、年龄、Lauren 分型、浸润深度、组织分化和组织病理类型均无明显相关。(表 1)

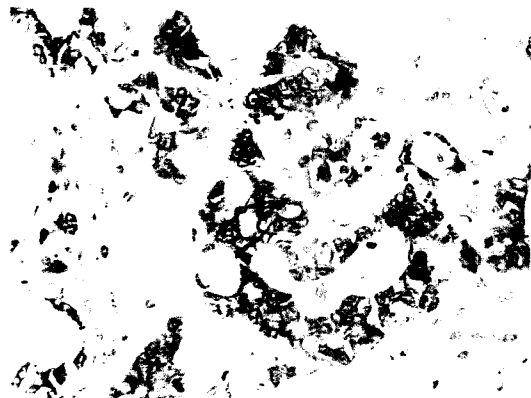


图 1 E-Cad 在正常组织中的表达(SP ×200)

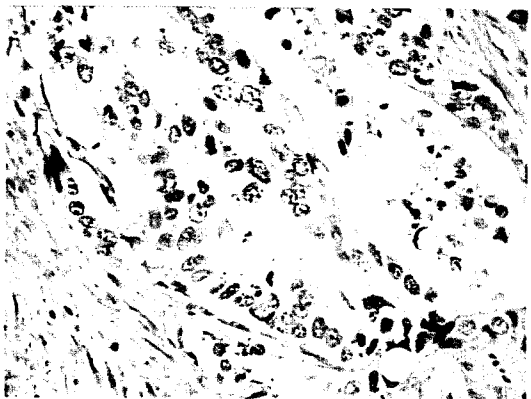


图 2 MMP-9 在正常胃组织中的表达(SP ×200)

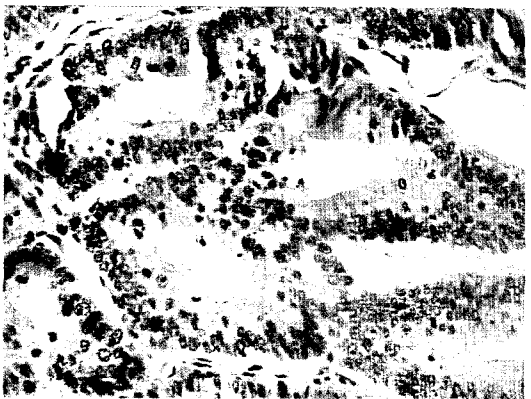


图 3 E-Cad 在胃癌组织中的表达(SP ×200)

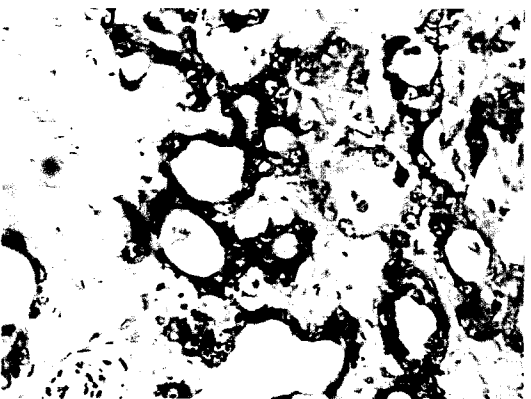


图 4 MMP-9 在胃癌组织中的表达(SP ×200)

表 1 E-Cad、MMP-9 表达与胃癌临床病理特征的关系(例)

变量	E-Cad		MMP-9	
	阴性	阳性	阴性	阳性
年龄				
<60 岁	14	24	7	31
≥60 岁	36	34	20	50
性别				
男	41	45	21	65
女	9	13	6	16
肿瘤大小				
<5 cm	42	23 <sup>△</sup>	20	45 <sup>△</sup>
≥5 cm	8	35	7	36
组织分化				
高、中分化	45	41 <sup>△</sup>	24	62
低分化	5	17	3	19
Lauren 分型				
肠型	19	37 <sup>△</sup>	15	41
弥漫型	24	9	7	24
混合型	9	12	5	16
组织病理类型				
腺癌	32	48 <sup>△</sup>	22	58
未分化癌	7	1	1	7
粘液腺癌	3	3	2	4
印戒细胞癌	8	6	2	12
浸润深度				
T1 ~ T2	21	11 <sup>△</sup>	10	22
T3 ~ T4	29	47	17	59
分期(TNM)				
I ~ II	42	18 <sup>△</sup>	20	40 <sup>△</sup>
III ~ IV	8	40	7	41
淋巴结转移				
阳性	20	34	9	45 <sup>△</sup>
阴性	30	24	18	36

注:两组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△</sup> $P < 0.01$

2.4 E-Cad 和 MMP-9 表达与胃癌预后的关系 E-Cad 表达阳性率高者及 MMP-9 表达阳性率低者,其 5 年生存率均较高(表 2)。

表 2 E-Cad 和 MMP-9 阳性表达率与预后的关系(例)

组别	例数	E-Cad		MMP-9	
		阴性	阳性	阴性	阳性
生存期 <5 年	75	42	33	6	69
生存期 ≥5 年	33	8	25 <sup>△</sup>	21	12 <sup>△</sup>

注:两组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$

3 讨论

浸润、转移是恶性肿瘤的重要特征,肿瘤的浸润转移是包含一系列复杂步骤的癌细胞与细胞外基质相互作用的结果,其中癌细胞与原发灶失去黏附脱落是一个早期和必要的步骤。

E-Cad 是一种钙依赖性的具有黏附特性的跨膜糖蛋白,与其胞质区相关蛋白  $\alpha$ -连环素、 $\beta$ -连环素、 $\gamma$ -连环素相互作用,构成复合结构,从而使细胞膜和细胞骨架紧密连接,其主要介导同种细胞间的粘附反应,具有钙依赖性,是与癌细胞侵袭转移密切相关的上皮细胞分布性粘附分子。近年的研究表明,E-Cad 的突变和表达量的变化与肿瘤的发生和转移密切相关。E-Cad 的减少、异质性和非极性分布使细胞间的黏附减弱,癌细胞易于脱落,这是癌转移的首要环节。研究也发现转移性胃癌 E-Cad 表达量显著低于原发性胃癌,多因素分析显示淋巴结转移 E-Cad 表达缺失或转移部位 E-Cad 免疫组化阴性是胃癌预后较差的独立危险因素<sup>[1]</sup>。E-Cad 基因 (CDH1) 失功能与弥漫性胃癌易感性有关,同时 CDH1 胚系失活突变是遗传性弥漫性胃癌 (HDGC) 综合征的重要特征。CDH1 启动子甲基化是弥漫性胃癌发生的关键过程,CDH1 可望成为抗甲基化等肿瘤治疗的重要靶点。弥漫性胃癌早期存在第二 CDH1 打击点,E-Cad 表观遗传下调是肿瘤恶变的开始,CDH1 甲基化是可逆的,并干扰胃癌发生的早期阶段<sup>[2]</sup>。有学者采用 E-Cad 胃内胶囊收集弥漫性胃癌患者胃液,检测胃液中肿瘤脱落细胞 CDH1 启动子甲基化状态,发现此方法可以很好区分肿瘤和正常对照,可能是一种有用而无创的弥漫性胃癌早期监测方法<sup>[3]</sup>。E-Cad 低表达是胃癌淋巴结微转移的独立危险因素,淋巴结微转移者 5 年生存率较低,原发肿瘤 E-Cad 的表达水平可作为胃癌有用的预后标志<sup>[4]</sup>。

本研究表明,E-Cad 表达异常不但与肿瘤细胞的低分化、高侵袭性和转移性相关,同时也直接影响着患者的预后。另外,本结果证实,E-Cad 在正常胃粘膜上皮细胞均为阳性表达,而 53.7% 的胃癌组织呈低表达或无表达。E-Cad 的表达与肿瘤分化程度显著相关。还与病理组织类型有关。腺癌的表达是 60% (48/80),而未分化癌的阳性表达率仅为 12.5% (1/8),这可能与 E-Cad 参与细胞分化或形态发生过程的调节有关。

除了肿瘤失去正常黏附,从原发灶脱落外,基底膜和细胞外基质的降解在肿瘤细胞从原发灶脱落、穿越基底膜和细胞外间质,进入脉管的过程中是必需的步骤。MMPS 是一组与锌结合的主要分解细胞外基质的蛋白酶,与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切,近年来研究表明,基质金属蛋白酶家族成员中的 MMP-9,能有效地分解基底膜的主要成分 IV 型胶原蛋白,具有转移倾向的癌细胞可自身分泌或诱导其

他细胞分泌大量的 MMP-9,基底膜的完整性遭到破坏,促进肿瘤转移的发生<sup>[5]</sup>。对在直肠癌、胰腺癌、肺腺癌等多种实体肿瘤的癌细胞和细胞外基质中均有 MMP-9 的高表达,其过度表达与肿瘤的远处转移及周围组织的侵袭密切相关。研究发现进展期胃癌 MMP-9 表达与淋巴结转移密切相关<sup>[6]</sup>。MMP-9 在胃癌组织中高表达,且与肿瘤的分化程度有关,分化程度越低,其阳性表达率越高<sup>[7]</sup>。MMP-9 是胃癌预后差的独立危险因素,而且可以成为评价胃癌预后的肿瘤分子标志<sup>[8]</sup>。胃癌患者血清中 MMP-9 水平与超声内镜术前分期相关,当血清中 MMP-9 水平明显升高时,患者肿瘤可能侵犯浆膜或浆膜外,EUS (超声内镜) 和 MMP-9 联合检测可以评价胃癌的浸润和转移<sup>[9]</sup>。

本组研究发现 MMP-9 主要表达在胃癌细胞的胞浆中,且癌巢周围的肿瘤细胞阳性表达更高,说明癌巢周边的肿瘤细胞可以分泌更多的 MMP-9,以利于降解细胞外基质及血管基底膜构成的天然屏障,使得肿瘤细胞更易于移出癌巢和进出血管,从而向周围侵袭。本组资料发现,E-Cad 低表达、MMP-9 的高表达状态与胃癌的生长、浸润和转移等恶性生物学行为密切相关。

故 E-Cad 与 MMP-9 可作为胃癌的生物学行为的重要指标。

#### 【参考文献】

- [1] Kim JH, Kim MA, Lee HS, et al. Comparative analysis of protein expressions in primary and metastatic gastric carcinomas[J]. Hum Pathol, 2009, 40(3):314-322.
- [2] Humar B, Blair V, Charlton A, et al. E-cadherin deficiency initiates gastric signet-ring cell carcinoma in mice and man[J]. Cancer Res, 2009, 69(5):2050-2056.
- [3] Muretto P, Ruzzo A, Pizzagalli F, et al. Endogastric capsule for E-cadherin gene (CDH1) promoter hypermethylation assessment in DNA from gastric juice of diffuse gastric cancer patients[J]. Ann Oncol, 2008, 19(3):516-519.
- [4] Kim JH, Park JM, Jung CW, et al. The significances of lymph node micrometastasis and its correlation with E-cadherin expression in pT1-T3N0 gastric adenocarcinoma[J]. J Surg Oncol, 2008, 97(2):125-130.
- [5] 张建军,刘志明. MMP-9, TIMP-1 和 IV 型胶原在甲状腺癌中的表达及其临床意义[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(1):81-84.
- [6] Czyżewska J, Guzińska-Ustymowicz K, Kemon A, et al. The expression of matrix metalloproteinase 9 and cathepsin B in gastric carcinoma is associated with lymph node metastasis, but not with postoperative survival [J]. Folia Histochem Cytobiol, 2008, 46(1):57-64.

(下转第 321 页)

度亦越高,而各组 MODS 患者血浆 CRP 水平在整个观察期间一直处于高水平状态,与疾病进展无关。发病头两天,MODS 患者死亡病例血浆 PCT 水平与生存病例之间无差异。发病第 3 天起,死亡病例患者血浆 PCT 含量开始急剧升高,生存病例血浆 PCT 水平升高幅度较小。MODS 患者死亡病例血浆 CRP 水平与生存病例血浆 CRP 水平无差异。本文进一步观察到,血浆 PCT 含量的上升水平及其动态变化情况与 MODS 严重程度及预后有关,监测血浆 PCT 水平有利于对病情作出全面评估,从而及早治疗,改善预后。因此,血浆 PCT 含量检测结合器官功能 SOFA 评分能够为 MODS 诊断及预后评估提供可靠依据。关于 MODS 患者疾病过程中血浆 PCT 水平增高的具体分子水平机制尚待进一步研究。

### 【参考文献】

- [1] Vincent JL, Moreno R, Takala J, et al. The SOFA (sepsis related organ failure assessment) score to describe organ dysfunction/failure[J]. Intensive Care Med, 1996, 22 (7):707-710.
- [2] Castelli GP, Pognani C, Meisner M, et al. Procalcitonin and C-reactive protein during systemic inflammatory response syndrome, sepsis and organ dysfunction[J]. Crit Care, 2004, 8 (4):234-242.
- [3] Becker KL, Snider R, Nylen ES. Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: clinical utility and limitations [J]. Crit Care Med, 2008, 36(3):941-952.
- [4] American College of Chest Physicians Society of Critical Care Med-

icine Consensus Conference. Definitions for sepsis and multiple organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis [J]. Crit Care Med, 1992,20(6): 864-874.

- [5] Beger HG, Rau BM. Severe acute pancreatitis: Clinical course and management[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13 (38):5043-5051.
- [6] Don M, Valent F, Korppi M. Differentiation of bacterial and viral community-acquired pneumonia in children[J]. *Pediatr Int*, 2009, 51(1):91-96.
- [7] Deis JN, Creech CB, Estrada CM, et al. Procalcitonin as a marker of severe bacterial infection in children in the emergency department[J]. *Pediatr Emerg Care*, 2010, 26(1):51-60.
- [8] Nakamura A, Wada H, Ikejiri M, et al Efficacy of procalcitonin in the early diagnosis of bacterial infections in a critical care unit[J]. *Shock*, 2009, 31(6):586-591.
- [9] 丁雪燕, 罗荣荣. 急性冠脉综合征血清脑钠肽水平及阿托伐他汀对其影响[J]. *东南国防医药*, 2009, 11(1):37-38.
- [10] Azarpira N, Ramzi M, Aghdaie M, et al. Procalcitonin and C-reactive protein serum levels after hematopoietic stem-cell transplant [J]. *Exp Clin Transplant*, 2009, 7(2):115-118.
- [11] Rey C, Los Arcos M, Concha A, et al. Procalcitonin and C-reactive protein as markers of systemic inflammatory response syndrome severity in critically ill children[J]. *Intensive Care Med*, 2007, 33(3):477-484.
- [12] Spapen HD, Hachimi-Idrissi S, Corne L, et al. Diagnostic markers of sepsis in the emergency department[J]. *Acta Clin Belg*, 2006, 61(3):138-142.

(收稿日期:2010-04-27;修回日期:2010-05-28)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)

(上接第 311 页)

- [7] 赵凤娟,康春生,崔小伟,等.基质金属蛋白酶-9、血管内皮生长因子和增殖细胞核抗原在胃腺癌表达的相关性及临床意义[J].中华内科杂志,2009,48(2):114-117.
- [8] Zhao ZS, Wang YY, Ye ZY, et al. Prognostic value of tumor-related molecular expression in gastric carcinoma[J]. Pathol Oncol Res, 2009, 15(4):589-596.

- [9] Tan SY, Wang JY, Shen L, et al. Relationship between preoperative staging by endoscopic ultrasonography and MMP-9 expression in gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13 ( 14 ) : 2108-2112.

(收稿日期:2010-01-02;修回日期:2010-04-08)

(本文编辑:潘雪飞; 英文编辑:王建东)