

• 实验研究 •

基质金属蛋白酶-2 和唾液酸化 Lewis-X 在乳腺癌中的表达及其意义

尚培中 张金江 贾国洪 李永庆 苗建军 李晓武 谷化平

【摘要】 目的 研究基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和唾液酸化 Lewis-X(sialyl Lewis-X, SLeX)蛋白在乳腺癌组织中表达及其与淋巴结转移的关系。**方法** 应用免疫组织化学微波-链霉菌素-生物素(microwave-labelled strept- avidin biotin, MW-LSAB)法检测 120 例乳腺癌原发灶、71 例癌转移淋巴结和 30 例远离癌组织的正常乳腺上皮细胞 MMP-2 和 SLeX 蛋白的表达水平。**结果** MMP-2 和 SLeX 的表达在正常乳腺组织上皮细胞中阳性率分别为 16.7% (5/30) 和 20.0% (6/30), 在乳腺癌原发灶中阳性率分别为 78.3% (94/120) 和 86.7% (104/120), 两者在癌组织与正常乳腺组织中阳性率之间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 120 例乳腺癌患者中, 有淋巴结转移者乳腺癌原发灶 MMP-2 和 SLeX 阳性率分别为 84.5% (60/71) 和 100.0% (71/71), 无淋巴结转移者分别为 69.4% (34/49) 和 67.3% (33/49), MMP-2 差异无统计学意义 ($P > 0.05$), SLeX 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在癌转移淋巴结中, MMP-2 和 SLeX 的阳性率分别为 21.1% (15/71) 和 88.7% (63/71), 后者与原发癌组织中的表达具有较高一致性 ($r = 0.874, P < 0.05$)。**结论** 乳腺癌组织中 MMP-2 和 SLeX 均呈高水平表达, 并且后者与淋巴结转移密切相关。作为预测乳腺癌浸润和转移的肿瘤相关抗原, 联合检测对评估患者预后具有重要实用价值。

【关键词】 乳腺癌; 基质金属蛋白酶-2; 唾液酸化 Lewis-X; 浸润; 转移

【中图法分类号】 R737.9 **【文献标识码】** A

Expressions of matrix metalloproteinase-2 and sialyl Lewis-X in breast carcinoma and the significance SHANG Pei-zhong, ZHANG Jin-jiang, JIA Guo-hong, LI Yong-qing, MIAO Jian-jun, LI Xiao-wu, GU Hua-ping. Department of General Surgery, The 251th Hospital of PLA,

Zhangjiakou 075000, China

【Abstract】 Objective To investigate the expressions of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and sialyl Lewis-X (SLeX) in breast carcinoma and their relationships with lymph node metastasis and prognosis. **Methods** The expressions of MMP-2 and SLeX in breast carcinoma ($n = 120$ cases), metastatic lymph nodes ($n = 71$ cases) and normal epithelial tissue remote from carcinoma ($n = 30$ cases) were studied with microwave-labelled streptavidin biotin immunohistochemical method. **Results** The positive rates of MMP-2 and SLeX expressions were 16.7% (5/30) and 20.0% (6/30) in normal breast tissue, and 78.3% (94/120) and 86.7% (104/120) in breast carcinoma, respectively. The expressions of MMP-2 and SLeX in breast carcinoma were significantly higher than in the normal breast tissues ($P < 0.05$). There was no difference in MMP-2 expression in the primary of breast carcinoma between patients with lymphaden metastasis and patients without lymphaden metastasis ($P > 0.05$). The positive rate of SLeX in the primary breast carcinoma with lymphaden metastasis was higher than that without lymphaden metastasis ($P < 0.05$). The positive rates of MMP-2 and SLeX expressions were 21.1% (15/71) and 88.7% (63/71) in metastatic lymph nodes, respectively. The expression of SLeX in metastatic lymph nodes was corresponding to that in the primary of breast carcinoma ($r = 0.874, P < 0.05$). **Conclusion** MMP-2 and SLeX were both highly expressed in breast carcinoma. SLeX was closely related to lymphaden metastasis. MMP-2 and SLeX, as a tumor-associated antigen in breast carcinoma, can be used as important markers to predict invasion, metastasis and prognosis.

【Key words】 Breast carcinoma; Matrix metalloproteinase-2; Sialyl Lewis-X; Infiltration; Metastasis

近年研究发现,基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)和唾液酸化 Lewis-X(sialyl Lewis-X, SLeX)在肿瘤浸润和转移过程中发挥了重要作用^[1-6]。为研究它们在乳腺癌中的表达状况,作者应用免疫组织化学微波-链霉菌素-生物素(microwave-labelled strept-avidin biotin, MW-LSAB)法对 120 例乳腺癌标本中的 MMP-2 和 SLeX 表达进行检测,探讨它们与乳腺癌浸润及淋巴结转移的关系。

1 材料与方法

1.1 一般资料

选取解放军第 251 医院 1994 年 6 月至 2003 年 6 月手术切除并经病理学证实的乳腺癌患者 120 例,均为女性,年龄 26 ~ 76 岁,平均年龄 50.8 岁。在手术中切取 120 例乳腺癌原发灶、71 例癌转移淋巴结和 30 例远离原发癌灶

2.5 cm 以上的正常乳腺组织,所取标本均经病理学证实。术前均未施行过放疗、化疗及免疫治疗。临床分期:Ⅰ期 23 例,Ⅱ期 77 例,Ⅲ期 16 例,Ⅳ期 4 例。其中浸润性导管癌 72 例,管内癌 4 例,浸润性小叶癌 19 例,髓样癌 11 例,硬癌 7 例,湿疹样癌和炎性乳癌各 2 例,大汗腺癌、分泌型癌和富脂质细胞癌各 1 例。组织学分级按照卫生部“恶性肿瘤诊治规范”标准^[7]:Ⅰ级 61 例,Ⅱ级 42 例,Ⅲ级 17 例。所有标本经 10% 甲醛固定 24 h,常规脱水、透明和包埋,4 μm 厚连续石蜡切片。

1.2 主要试剂

兔抗人 MMP-2 多克隆抗体和鼠抗人 SLeX 单克隆抗体及 LSAB 试剂盒均购自宜康生物技术有限公司(均为即用型)。

1.3 MMP-2 和 SLeX 的检测

采用 MW-LSAB 法,对同一患者同一蜡块相邻组织切片分别进行 MMP-2 和 SLeX 染色。主要操作步骤:将切片常规脱蜡水化后,放入枸橼酸缓冲液(10 mmol/L, pH 6.0)内,用微波仪 170 W 辐射 5 min,冷却后水洗。其他操作流程同常规 LSAB 法,所不同者为三步抗原孵育和正常血清封闭用微波仪 130 W 分别辐射 5 min,保温 2 min 即可。 H_2O_2 -DAB 显色。实验用已知 MMP-2 和 SLeX 阳性乳腺癌组织作阳性对照,磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判断标准

背景染色清晰,组织标本呈棕黄色染色者为阳性,无明显阳性反应细胞者为阴性。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 13.0 软件包进行 χ^2 检验和相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-2 蛋白表达的检测结果

MMP-2 阳性染色主要分布于肿瘤细胞质内(图 1),癌组织与正常乳腺组织中表达的差异有统计学意义($\chi^2 = 40.671, P < 0.05$)。在 120 例乳腺癌患者中,有淋巴结转移者与无淋巴结转移者之间,乳腺癌原发灶 MMP-2 阳性表达率差异无统计学意义($\chi^2 = 3.065, P > 0.05$, 表 1)。在癌转移淋巴结中 MMP-2 阳性表达率(21.1%, 15/71)与乳腺癌原发灶阳性表达率(78.3%, 94/120)之间差异有统计学意义($\chi^2 = 59.583, P < 0.05$)。

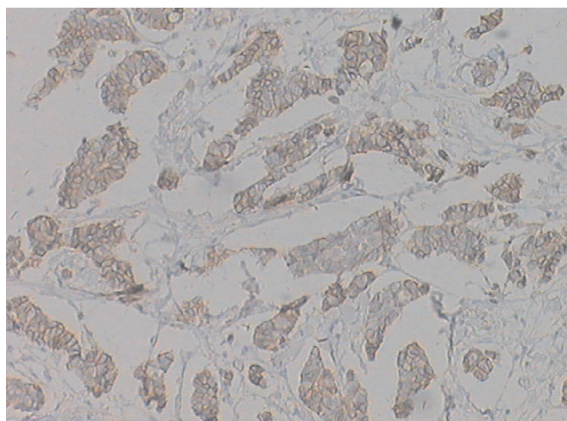
图 1 乳腺癌 MMP-2 免疫组化阳性染色(MW-LSAB 法 $\times 200$)

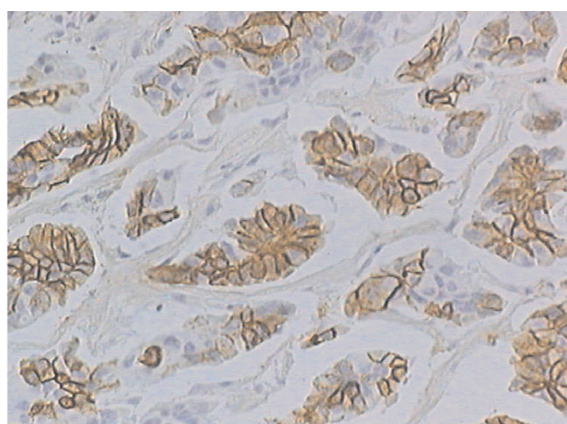
表 1 MMP-2 和 SLeX 蛋白在乳腺良恶性组织中的表达

分组	例数	MMP-2		SLeX	
		阳性例数	百分率(%)	阳性例数	百分率(%)
正常乳腺组织	30	5	16.7	6	20.0
乳腺癌组织	120	94	78.3	104	86.7
无淋巴转移	49	34	69.4	33	67.3
有淋巴转移	71	60	84.5 ^a	71	100.0 ^b

a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$, 与无淋巴转移比较

2.2 SLeX 蛋白表达的检测结果

SLeX 阳性染色主要分布于肿瘤细胞质(图 2), 癌组织与正常乳腺组织中表达差异有统计学意义($\chi^2 = 54.545, P < 0.05$)。在 120 例乳腺癌患者中, 有淋巴结转移者与无淋巴结转移者之间, 乳腺癌原发灶 SLeX 阳性表达率差异有统计学意义($\chi^2 = 26.750, P < 0.05$, 表 1)。在癌转移淋巴结中 SLeX 阳性表达率(88.7%, 63/71)与乳腺癌原发灶阳性表达率(86.7%, 104/120)之间差异无统计学意义($\chi^2 = 0.173, P > 0.05$)。

图 2 乳腺癌 SLeX 免疫组化阳性染色(MW-LSAB 法 $\times 200$)

2.3 MMP-2 与 SLeX 蛋白表达的差异

在正常乳腺组织上皮细胞中, MMP-2 阳性表达率(16.7%)与 SLeX(20.0%)之间差异无统计学意义($\chi^2 = 0.111, P > 0.05$);在乳腺癌原发灶中两者差异亦无统计学意义(78.3% vs 86.7%, $\chi^2 = 2.886, P > 0.05$);但在癌转移淋巴结中 MMP-2 阳性表达率 21.1%, SLeX 阳性表达率 88.7%, 后者高于前者, 差异有统计学意义($\chi^2 = 65.538, P < 0.05$)。SLeX 在癌转移淋巴结中的表达与乳腺癌原发灶中的表达具有较高一致性($r = 0.874, P < 0.05$)。

3 讨论

浸润和转移是乳腺癌患者死亡的主要原因。癌组织周围微环境中多种分子失调, 是肿瘤浸润、转移的内在因素。其发生、发展是多步骤连续过程, 包括癌细胞黏附基底膜, 降解局部蛋白, 癌细胞游走等。肿瘤细胞从原发灶脱离, 自身能分泌或诱导宿主分泌一系列降解基底膜和间质的溶解酶, 通过多种途径降解细胞外基质蛋白, 才可越过基质屏障进行迁移。在参与破坏细胞外基质的酶类中, 基质金属蛋白酶(MMP)在此过程中发挥了重要作用, 几乎可以分解细胞外基质的各种成分, 促进肿瘤浸润、转移。MMP-2 是基质金属蛋白酶家族中与肿瘤关系最为密切的成员之一。它是一种锌离子依赖性蛋白酶, 是降解细胞外基质的主要酶类, 由肿瘤细胞和间质细胞以酶原形式分泌, 经水解后激活, 能特异性地降解基底膜的主要成分 IV 型胶原, 还可降解 V、VI、X 型胶原和明胶, 分解基底膜中的纤维黏连蛋白和层黏连蛋白, 在肿瘤细胞突破基底膜屏障发生浸润、转移的过程中发挥重要作用^[1-4]。曹道成等^[8]发现在淋巴结阴性乳腺癌患者中, MMP-2 的阳性表达具有较低的无复发生存率, 预后较差。

黏附分子在肿瘤细胞的浸润和转移过程中发挥着双重作用, 一方面肿瘤细胞必须先通过细胞黏附分子下调, 从原发灶脱落, 另一方面又需要通过细胞外基质受体或内皮细胞配体的上调, 与细胞外基质或血管内皮细胞黏附而移动, 才能形成转移灶。这一过程与肿瘤细胞表达的膜表面黏附分子密切相关, 无论是质或量的改变都会影响肿瘤细胞的浸润及转移能力。业已证实, 癌组织血型糖抗原的异常表达在肿瘤转移过程中起着重要作用, 其中包括选择素所识别并能结合的配体。近年研究表明, 作为一类细胞黏附分子, Lewis 血型决定簇抗原与配体分子选择素(selectin)的结合是恶性肿瘤转移的一条重要途径, 被称为 Lewis-Selectin 途径, 简称 LS 途径。SLeX 属 Lewis 血型决定簇 II

型抗原,是学者所熟知的肿瘤标志物单唾液酸神经节糖苷脂 CA19-9 (sialyl Lewis-A) 的同分异构体,其结构为 (NeuAc α 2 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4[Fuc α 1 \rightarrow 3]GlcNAc β 1 \rightarrow 3Gal β 1 \rightarrow 4Glc β 1 \rightarrow 1Cer)。李小卫等^[9]研究发现, SLeX 表达状况与结直肠癌转移潜能有关。谷化平等^[10-11]认为 SLeX 的高表达与肝癌、甲状腺癌等的发生、发展及浸润转移密切相关。

本研究应用免疫组化 MW-LSAB 法检测乳腺癌、癌转移淋巴结及其远离癌组织的正常乳腺组织上皮细胞 MMP-2 和 SLeX 表达状况,结果显示两者在正常乳腺组织上皮细胞中染色较弱,而在乳腺癌组织中,两者表达均显著增强。在有淋巴结转移与无淋巴结转移的患者中,原发癌组织中 MMP-2 表达差异无统计学意义, SLeX 表达差异有统计学意义。但在癌转移淋巴结中, MMP-2 表达阳性率明显低于 SLeX。后者在癌转移淋巴结中的表达与原发癌组织中的表达具有较高一致性,说明 MMP-2 在乳腺癌浸润过程中发挥了一定作用,但在淋巴结转移过程中的作用较弱;而 SLeX 则在乳腺癌浸润和淋巴结转移的全过程中均发挥着重要作用,尤其在乳腺癌淋巴结转移方面较 MMP-2 关系更为密切,其增强表达可能有利于促进淋巴结转移,对评估患者预后具有更重要的临床意义,可以作为研究乳腺癌病理机制,特别是淋巴及血行转移途径的具有实用价值的标志物。由于 SLeX 与 CA19-9 一样都系含唾液酸的糖抗原,易于脱落进入淋巴及血液循环中,所以不仅可以通过免疫组化方法在肿瘤组织中检测其高表达,而且也可通过 ELISA 法、逆转录聚合酶链式反应技术、流式细胞技术等检测其在淋巴及血液中的表达状况。目前,新辅助化疗在临床应用愈来愈广泛,其意义在于减少转移、复发,观察肿瘤反应,为手术后化疗提供参考依据,减少手术后化疗用药的盲目性,动态检测 SLeX 将有助于观察新辅助化疗及手术后放、化疗的疗效。

参考文献

- [1] 王穗暖,刘琦,宣井岗,等. 基质金属蛋白酶表达和 MVD 计数与垂体腺瘤侵袭性的关系研究. 中华神经医学杂志, 2006,5:30-32.
- [2] 曹旭晨,肖春花,冯玉梅,等. 乳腺癌转移相关蛋白 mRNA 定量表达与临床相关性研究. 肿瘤防治研究, 2006, 33:483-486.
- [3] 申培红,陈奎生,李珊珊,等. 乳癌组织中 nm23、MMP-2、TIMP-2 蛋白的表达. 郑州大学学报(医学版), 2007, 42:356-357.
- [4] 高毅,吴强,凌晓光,等. 抗 HERer-2 嵌合体 chA21 对卵巢癌细胞 MMP-2 和 TIMP-2 表达的影响. 西安交通大学学报(医学版), 2007,28:368-371.
- [5] 尚培中,谷化平,孙印臣. 唾液酸化 Lewis X 在大肠癌中的表达研究. 中华普通外科杂志, 2001,16:593-594.

- [6] 尚培中,谷化平. 乳腺癌 Lewis X 和唾液酸化 Lewis X 表达研究. 中国现代普通外科进展,2005,8:104-106.
- [7] 李树玲. 中国常见恶性肿瘤诊治规范(乳腺癌). 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990:59-609.
- [8] 曹道成,刘毅,后强,等. MMP-2、MMP-9、Cathepsin-D 在淋巴结阴性乳腺癌中的表达及其与预后的关系. 中华普通外科杂志,2005,20:510-512.
- [9] 李小卫,丁彦青,蔡俊杰,等. 唾液酸化的路易斯寡糖-X 抗原在结直肠癌细胞系 LoVo、HT29 中的表达及其与转移潜能的相关性. 中华病理学杂志,2000,29:119-122.
- [10] 谷化平,尚培中,倪灿荣. Sialyl Lewis X, CD44v6 和 E-cadherin 表达与肝细胞癌转移和预后的关系. 中华普通外科杂志,2003,18:109-111.
- [11] 谷化平,李德炳,张正猛,等. P53 和 sialyl Lewis-X 表达与甲状腺乳头状癌侵袭转移的关系. 西安交通大学学报(医学版),2005,26:71-73.

(收稿日期:2008-03-16)

(本文编辑:周艳)

尚培中,张金江,贾国洪,等. 基质金属蛋白酶-2 和唾液酸化 Lewis-X 在乳腺癌中的表达及其意义[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版,2008,2(2):177-183.