

ESM-1 和 MMP-3 表达与肝癌侵袭转移的关系

贺 军,丁成明,贺更生,黄秋林

(南华大学附属第一医院普外科, 湖南 衡阳 421001)

摘 要: **目的** 探讨内皮细胞特异性分子-1(ESM-1)和基质金属蛋白酶-3(MMP-3)表达与肝细胞癌(HCC)侵袭转移的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法与图像分析系统检测 ESM-1 和 MMP-3 在 40 例 HCC 组织(实验组)及 15 例肝胆管结石患者肝组织(对照组)的表达水平;分析 HCC 组织中 ESM-1、MMP-3 的表达与临床病理特征的关系及两者之间表达水平的相关性。**结果** ESM-1、MMP-3 在 HCC 组织中均高水平表达,对照组未见阳性表达,实验组与对照组间表达差异均有显著性($P < 0.05$);ESM-1 在 HCC 组织中的表达与甲胎蛋白含量、肝硬化、肿瘤大小、分化程度、门静脉侵犯及 TNM 分期有关($P < 0.05$);MMP-3 在 HCC 组织中的表达与门静脉侵犯、HBV 感染、肿瘤大小、分化程度及 TNM 分期有关($P < 0.05$);ESM-1 与 MMP-3 在 HCC 组织中的表达呈正相关($r = 0.641, P < 0.05$)。**结论** 检测 ESM-1、MMP-3 在 HCC 中的表达可能有助于对 HCC 侵袭和转移的评估。

关键词: 肝细胞癌; 内皮细胞特异性分子-1; 基质金属蛋白酶-3; 肿瘤侵袭转移

中图分类号:R735.7 **文献标识码:**A

Relationship Between Expression of ESM-1 and MMP-3 and Invasion and Metastasis of Human Hepatocellular Carcinoma

HE Jun, DING Chengming, HE Gengsheng, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, University of South China, Hengyang, Hunan 421001, China*)

Abstract: **Objective** To explore the relationship between expression of ESM-1 and MMP-3 and invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expression levels of ESM-1 and MMP-3 in 40 specimens with HCC (test group) and 15 specimens of liver tissue of intrahepatic bile duct stone (control group) were detected by immunohistochemistry and an image-analysis system. The relativity between the expression of ESM-1 and MMP-3 and clinicopathologic features and the correlation between the expression of ESM-1 and MMP-3 were analysed. **Results** ESM-1, MMP-3 were expressed at high level in all 40 specimens, but not expressed in liver tissues of 15 specimens with intrahepatic bile duct stone. There was significant difference of expression of ESM-1 and MMP-3 between test group and control group ($P < 0.05$). The expression of ESM-1 in HCC tissues was positively correlated with the level of preoperative serum alpha-fetoprotein (AFP), cirrhosis, tumor size, the histological differentiation, venous invasion and TNM stage ($P < 0.05$). The expression of MMP-3 was positively correlated with the HBV infection, tumor size, venous invasion, histological differentiation and TNM stage ($P < 0.05$). The mean gray scale of ESM-1 was positively correlated with that of MMP-3 ($r = 0.641, P < 0.05$). **Conclusions** ESM-1 and MMP-3 may be used as the new useful predictors of invasion and metastasis in patients with HCC.

Key words: hepatocellular carcinoma; endothelial cell specific molecule-1; matrix metalloproteinase -3; tumour invasion and metastasis

收稿日期:2012-03-05

基金项目:湖南省自然科学基金项目(11JJ3114).

通讯作者:贺军,电话:13973468818, E-mail: x3.1415926@163.com.

丁成明为并列第一作者.

研究表明,新生血管在肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)的发生、侵袭和转移中起关键的作用,新生血管不仅提供肿瘤生长所需营养,排除代谢产物,而且也是癌细胞播散的途径^[1]。内皮细胞

特异性分子-1 (endothelial cell specific molecule-1, ESM-1) 是一种可溶性糖蛋白,大量研究显示其具有非常广泛的生物学活性,可能通过多种信号传导途径参与肿瘤细胞免疫和肿瘤血管生成,与肿瘤发生及侵袭转移密切相关^[2]。基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase -3, MMP-3) 又称为基质分解素-1, 为 MMPs 中最重要的一种, MMP-3 不仅与肿瘤的生长有关,而且可以破坏基底膜,促使肿瘤的侵袭转移和血管生成^[3]。既然 ESM-1、MMP-3 均有促进肿瘤血管生成、参与肿瘤侵袭转移作用,那么其在 HCC 中表达情况如何呢? 目前国内外对此研究甚少。本实验将应用免疫组织化学法分析 HCC 组织中 ESM-1、MMP-3 的表达与临床病理特征的关系及两者之间表达水平的相关性,探讨 ESM-1、MMP-3 在 HCC 侵袭转移中的作用。

1 资料与方法

1.1 一般资料

实验组:收集南华大学第一附属医院肝胆胰外科和湖南省人民医院肝胆外科 2010 年 2 月~10 月 40 例 HCC 初治患者,均行手术治疗,术前均未行栓塞化疗、放疗、射频消融、无水酒精注射等治疗,取其癌灶组织为实验组标本,并收集其完整的临床、病理资料:平均年龄 51.0 岁(20~84 岁);男性 36 例,女性 4 例;HBV 阳性者 26 例,HBV 阴性者 14 例;甲胎蛋白(AFP)≥400 ng/mL 者 27 例,AFP<400 ng/mL 者 13 例;合并肝硬化 21 例,未合并肝硬化者 19 例;肿瘤直径≥5 cm 者 24 例,肿瘤直径<5 cm 者 16 例;高分化腺癌 12 例,中分化腺癌 17 例,低分化腺癌 11 例;TNM 分期中 I~II 期 18 例,III~IV 期 22 例;合并门静脉侵犯者 7 例,无门静脉侵犯 33 例。

对照组:收集上述医院同期 15 例肝内胆管结石患者手术切除肝组织标本为对照组。

1.2 主要试剂

鼠抗人 ESM-1 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司;兔抗人 MMP-3 单克隆抗体、第二代即用型免疫组织化学 Elivision™ Plus 广谱试剂盒与 DAB 染色试剂盒均购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学检测

标本石蜡切片进行脱蜡和水化处理;3% 过氧化氢溶液浸泡 15 min;蒸馏水冲洗,PBS 浸泡 5 min;抗原修复加 50 μL 的第一抗体(ESM-1 1:300,MMP-

3 1:00),4℃过夜;复温 30 min,PBS 冲洗。加 50 μL 第二代即用型免疫组化 Elivision™ Plus 广谱试剂盒试剂 A (聚合物增强剂),37℃孵育 20 min,PBS 冲洗;滴加第二代即用型免疫组化 Elivision™ Plus 广谱试剂盒试剂 B (辣根酶标记羊抗兔/鼠 IgG 多聚物),室温下孵育 30 min,PBS 冲洗;DAB 显色、苏木精复染、脱水、透明、中性树胶封片。结果判定:以细胞质、血管内皮细胞出现黄色或棕黄色颗粒为阳性。由图像处理软件进行分析计算平均灰度值。

1.4 统计方法

用 SPSS 13.0 软件,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用单因素方差分析;双变量计量资料的相关性分析用 Pearson 相关检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ESM-1、MMP-3 在不同肝组织中的表达水平

从图 1 可见,ESM-1、MMP-3 在 HCC 癌细胞中均呈阳性表达,阳性信号主要定位于胞质,部分定位于血管内皮细胞。对照组肝细胞均未见阳性表达。从表 1 可见,ESM-1、MMP-3 在 HCC 组织中表达平均灰度值明显低于对照组肝组织,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表 1 ESM-1、MMP-3 在 HCC 与对照组肝组织表达水平的比较

Table 1 Expression levels of ESM-1 and MMP-3 in HCC tissue and control liver tissue

组别	n	ESM-1 灰度值	MMP-3 灰度值
HCC 组	40	105.03 ± 2.58 ^a	103.00 ± 2.02 ^a
对照组	15	184.27 ± 3.13	164.90 ± 3.88

a:与对照组比较, $P < 0.05$

2.2 HCC 组织中 ESM-1、MMP-3 的表达水平与临床病理特征的关系

ESM-1 在 HCC 组织中的表达与年龄、性别、HBV 感染无关($P > 0.05$),与 AFP 含量、肝硬化、分化程度、门静脉侵犯、肿瘤大小、TNM 分期有关($P < 0.05$);MMP-3 在 HCC 组织中的表达与年龄、性别、AFP 含量、肝硬化无关($P > 0.05$),与 HBV 感染、门静脉的侵犯、肿瘤大小、分化程度、TNM 分期有关($P < 0.05$)(表 2)。

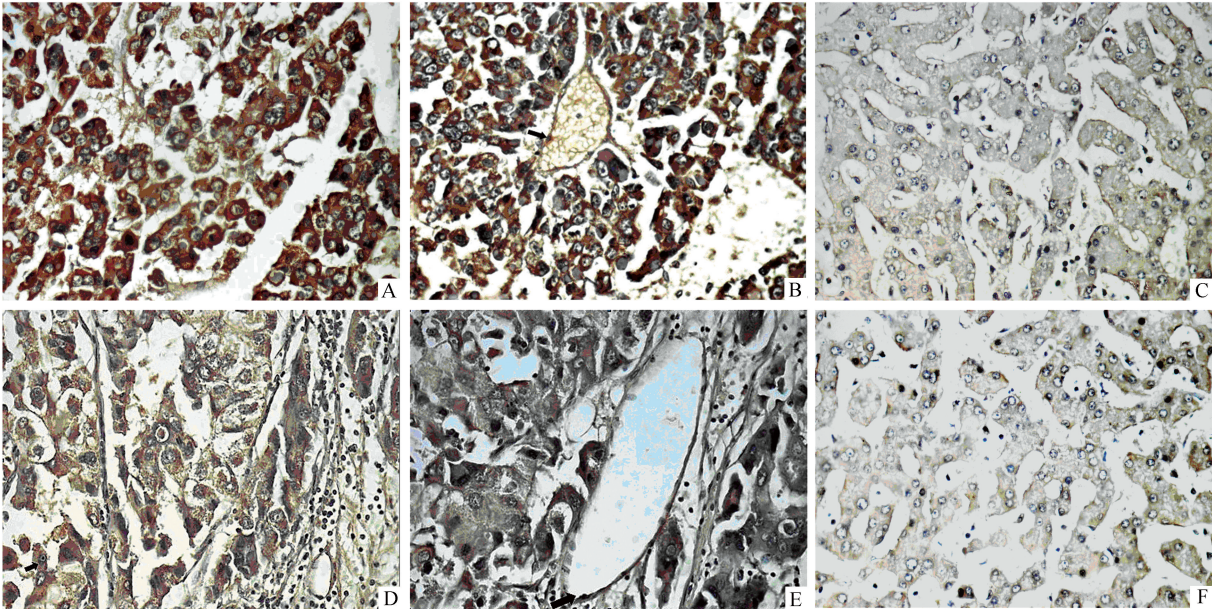


图 1 ESM-1、MMP-3 在不同肝组织中的表达水平 (× 400) A: ESM-1 在 HCC 组织中阳性表达;B:ESM-1 在 HCC 血管内皮细胞中阳性表达;C:ESM-1 在对照组肝组织中阴性表达;D:MMP-3 在 HCC 组织中阳性表达;E:MMP-3 在 HCC 血管内皮细胞中阳性表达;F:MMP-3 在对照组肝组织中阴性表达

Fig. 1 Theexpression level of ESM-1 , MMP-3 in different liver tissue (× 400)

表 2 HCC 组织中 ESM-1、MMP-3 表达水平及其与临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between expression levels of ESM-1 and MMP-3 in HCC tissue and clinical pathological features						
临床病理特征		<i>n</i>	ESM-1 灰度值	<i>P</i>	MMP-3 灰度值	<i>P</i>
年龄(岁)	≥60	10	104.70 ± 2.67	0.651	102.60 ± 2.01	0.348
	<60	30	105.13 ± 2.58		103.30 ± 2.02	
性别	男	36	105.00 ± 2.68	0.857	03.11 ± 2.11	0.898
	女	4	105.25 ± 1.50		103.25 ± 0.96	
HBV	阳性	26	104.54 ± 2.58	0.104	102.65 ± 1.74	0.042
	阴性	14	105.93 ± 2.40		104.00 ± 2.25	
AFP(ng/mL)	≥400	27	104.44 ± 2.34	0.038	102.74 ± 1.87	0.082
	<400	13	106.23 ± 2.71		103.92 ± 2.14	
肝硬化	有	21	104.05 ± 2.69	0.01	102.57 ± 2.11	0.067
	无	19	106.11 ± 2.00		103.74 ± 1.76	
肿瘤大小	≥5 cm	24	105.20 ± 2.96	0.000	103.96 ± 2.10	0.001
	<5 cm	16	102.75 ± 1.91		101.88 ± 1.02	
分化程度	高分化	12	107.92 ± 1.44	0.000 ^a	104.58 ± 1.62	0.039 ^a
	中分化	17	104.71 ± 1.65	0.000 ^b	103.29 ± 1.86	0.002 ^b
	低分化	11	102.36 ± 1.12		101.27 ± 1.01	
门静脉侵犯	有	7	103.28 ± 2.06	0.048	102.57 ± 1.62	0.022
	无	33	105.39 ± 2.55		105.24 ± 2.09	
TNM 分期	I、II	25	106.28 ± 2.26	0.000	103.96 ± 1.97	0.000
	III、IV	15	102.93 ± 1.49		101.73 ± 1.16	

a: 高分化与中分化比较;b: 中分化与低分化比较

2.3 HCC 组织中 MMP-3、ESM-1 表达的相互关系

ESM-1、MMP-3 在 HCC 癌细胞中表达的相关系数 $r=0.641$, $P<0.05$, 即两者呈正相关, 且具有统计学意义 (见图 2)。

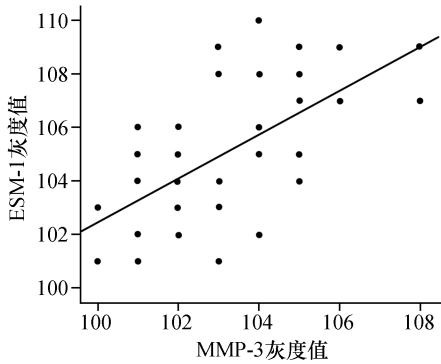


图 2 HCC 组织中 ESM-1 与 MMP-3 拟合曲线图 $r = 0.641$, $P < 0.05$

Fig.2 Fitting curve of ESM-1 and MMP-3 in HCC tissue

3 讨 论

绝大多数肿瘤的恶性程度都是与肿瘤组织血管的丰富程度呈正相关, 高侵袭性肿瘤是以丰富的血管形成为标志^[4]。文献[5]资料显示, ESM-1 可作为血管内皮细胞新生的标记物, 与血管生成标志物血管内皮生成因子 (VEGF) 关系密切, 后者通过 3-磷酸肌醇激酶 (PI3K)-Akt 信号通路调节 ESM-1 的表达, ESM-1 通过旁分泌的方式作用于肿瘤细胞。本实验通过免疫组织化学法显示 ESM-1 阳性表达部分定位于微血管内皮细胞中, 提示 ESM-1 与肿瘤血管密切相关。本实验还发现, ESM-1 在 HCC 中的表达: AFP ≥ 400 ng/mL 组表达强度明显大于 AFP < 400 ng/mL 组, 有肝硬化组表达强度明显大于无肝硬化组, 肿瘤大小 ≥ 5.0 cm 组表达强度明显大于肿瘤大小 < 5.0 cm 组, 低分化腺癌组表达强度明显大于高分化腺癌组、中分化腺癌组, 有门静脉侵犯组表达强度明显大于无门静脉侵犯组, TNM III、IV 组表达强度明显大于 TNM I、II 组。由此推测: HCC 组织中 ESM-1 表达与 AFP 阳性强度、肝硬化、门静脉侵犯、分化程度、TNM 分期有关 (P 均 < 0.05), 这与 L-Y Chen 等^[6]的研究基本一致, 提示 ESM-1 表达与 HCC 侵袭转移密切相关。

许多研究已经表明 MMPs 可以促进肿瘤的侵袭

转移及血管生成^[3]。MMP-3 又称为基质分解素-1, 是 MMPs 中最为重要的一种。本实验得出, MMP-3 在 HCC 组织中呈阳性表达, 在对照组中呈阴性表达, 主要分布在 HCC 细胞的细胞质中和细胞膜上, 血管内皮细胞中也有表达, 提示 MMP-3 可能与 HCC 的发生、血管生成密切相关。本实验还得出, MMP-3 在 HCC 中的表达 HBV 阳性组表达强度明显大于 HBV 阴性组, 肿瘤大小 ≥ 5.0 cm 组表达强度明显大于肿瘤大小 < 5.0 cm 组, 低分化腺癌组表达强度明显大于高分化腺癌组、中分化腺癌组, 有门静脉侵犯组表达强度明显大于无门静脉侵犯组, TNM III、IV 组表达强度明显大于 TNM I、II 组。由此推测: HCC 中 MMP-3 的表达与 HCC 的 TNM 分期、肿瘤大小、HBV 感染有关, 此结果与 Okamoto 等^[7]研究结果相近。

本实验分析 HCC 组织中 ESM-1 与 MMP-3 表达水平之间的相互关系, 表明 HCC 组织中 ESM-1 与 MMP-3 表达呈正相关 ($r = 0.641$, $P < 0.05$), 提示 ESM-1、MMP-3 在 HCC 的侵袭、转移中密切相关甚至两者在 HCC 中表达强度可能具有协同作用。本实验显示 ESM-1、MMP-3 在 HCC 组织中表达均与年龄、性别无关, 均与分化程度、TNM 分期有关等一致性现象, 亦提示 HCC 组织中 ESM-1、MMP-3 两者之间具有密切的关系, 提示在 HCC 的侵袭和转移中, ESM-1、MMP-3 之间具有密切的内在联系, 甚至两者在 HCC 的侵袭转移过程中可能起着协同作用。

在 HCC 的发生及侵袭转移过程中, 是否由于 ESM-1 蛋白大量生成, 从而促进 MMP-3 转录活性升高, 进而两者协同作用刺激肿瘤新生血管的形成及促进 HCC 的侵袭与转移, 亦或由于 MMP-3 转录活性升高, 引起 ESM-1 蛋白分泌增加, 进而两者协同作用刺激肿瘤血管形成及促进 HCC 的侵袭与转移, 目前尚不明确, 但由本实验可推断出在 HCC 的侵袭和转移中 ESM-1、MMP-3 之间具有密切的内在联系。其相关性的确切机制目前尚不清楚, 相关机制可能为: 金属基质蛋白酶的启动子中有与转录因子 Ets 基序 (EMS-1 基因启动子中的一段基序) 相结合的部位^[8], MMP-3 可能通过其启动子与 Ets 结合, 促进 ESM-1 的分泌, 共同参与 HCC 血管生成、侵袭和转移; 另外有学者认为 MMP-3 可能通过其自身的反式作用因子 AMF/PGI 激活 3-磷酸肌醇激酶 (PI3K)-Akt 信号转导途径来诱导肝癌细胞的侵袭转移^[9], ESM-1 的表达同样与 PI3K-Akt 信号转导途

径密切相关。因此推测 ESM-1、MMP-3 在 HCC 中表达水平的协同作用还可能与 PI3K-Akt 信号通路有关。

总之,联合检测 ESM-1 和 MMP-3 的表达水平可能有助于对 HCC 的侵袭转移危险程度的正确评估,进而可能有助于对 HCC 患者术后预后情况如术后 5 年生存率、术后转移危险程度等进行预测和评估。下一步将通过扩大 HCC 样本数量、RT-PCR 技术定量分析 HCC 组织中 ESM-1 及 MMP-3 的表达水平、对 HCC 患者行术后随访等方法行进一步研究,以期得出更为精确的结论。

参考文献:

- [1] 李秋萍,王双双. 血管内皮生长因子在原发性肝细胞肝癌中的表达及临床意义[J]. 南华大学学报(医学版),2010,38(1):74-76.
- [2] Sarrazin S,Adam E,Lyon M,et al. Endocan or endothelial cell specific molecule-1 -(ESM-1): a potential novel endothelial cell marker and a new target for cancer therapy[J]. Biochim Biophys Acta ,2006,1765(1): 25-37.
- [3] La Rocca G,Pacci-Minafia I,Marrazzo A,et al. Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera [J]. Br J Cancer, 2004,90(7):1414-1421.
- [4] Zhang D,Hedlund EM,Lim S,et al. Antiangiogenic agents significantly improve survival in tumor-bearing mice by increasing tolerance to chemotherapy-induced toxicity [J]. Proc Natl Acad Sci USA,2011 ,108(10):4117-4122.
- [5] 刘从云,吴正升,张晴,等. 乳腺癌组织中 ESM-1 的表达及其预后意义 [J]. 安徽医科大学学报,2008,43(4):391-394.
- [6] Chen LY,Liu X, Wang SL,et al. Over-expression of the endocan gene in endothelial cells from hepatocellular carcinoma is associated with angiogenesis and tumour invasion [J]. J Int Med Res,2010,38(2):498-510.
- [7] Okamoto K, Mandai M, Mimura K,et al. The association of MMP-1, -3 and-9 genotypes with the prognosis of HCV-related hepatocellular carcinoma patients [J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol,2005,117-118:77-89.
- [8] Wen Ling Shiha,Ming Hui Liaob, Feng Ling Yubc,et al. AMF/PGI transactivates the MMP-3 gene through the activation of Src-RhoA- phosphatidylinositol 3- kinase signaling to induce hepatoma cell migration [J]. Cancer Letter,2008,270(2): 202-217 .
- [9] Oikawa T, Yamada T. Molecular biology of the ets family of transcription factors [J]. Gene,2003,303:11-34.