

## 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子和微血管密度与涎腺肿瘤侵袭性的关系

黄志权<sup>1</sup>, 李劲松<sup>1</sup>, 陈伟良<sup>1</sup>, 李海刚<sup>2</sup>, 王建广<sup>1</sup>, 张 彬<sup>1</sup>  
(中山大学附属第二医院 1. 口腔科; 2. 病理科, 广东 广州 510120)

**摘要:**【目的】检测涎腺肿瘤组织中细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)的表达和微血管密度(MVD)值,探讨 EMMPRIN 和 MVD 对涎腺常见肿瘤的侵袭性方面的生物学作用机理。【方法】用 SP 免疫组织化学法检测 9 例正常涎腺组织,28 例多形性腺瘤,25 例黏液表皮样癌,33 例腺样囊性癌中 EMMPRIN 的表达和 MVD 值。【结果】EMMPRIN 在正常涎腺组织、多形性腺瘤、黏液表皮样癌、腺样囊性癌的表达阳性率分别为 1/9、54%、84%、91%( $P < 0.05$ )。MVD 值在四组样本间的差异具有统计学意义;黏液表皮样癌和腺样囊性癌的 MVD 值均高于多形性腺瘤。EMMPRIN 表达阳性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值高于 EMMPRIN 表达阴性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值。【结论】EMMPRIN 通过刺激 MMPs 和肿瘤血管的生成,使不同的涎腺肿瘤具有相应的侵袭性和恶性潜能。EMMPRIN 和 MVD 可以作为判断涎腺肿瘤侵袭性的重要指标。

**关键词:**涎腺肿瘤;基质金属蛋白酶;细胞外基质金属蛋白酶诱导因子;微血管密度;侵袭性

中图分类号:R739.85

文献标识码:A

文章编号:1672-3554(2008)01-0051-04

### Effect of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer and Microvessel Density in Invasion of Salivary Gland Tumor

HUANG Zhi-quan<sup>1</sup>, LI Jin-song<sup>1</sup>, CHEN Wei-liang<sup>1</sup>,  
LI Hai-gang<sup>2</sup>, WANG Jian-guang<sup>1</sup>, ZHANG Bin<sup>1</sup>

(1. Department of Stomatology, 2. Department of Pathology, The Second Affiliated Hospital,  
SUN Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract:** 【Objective】To detect the expression of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) and microvessel density (MVD) in salivary gland tumours and explore the mechanism of EMMPRIN and MVD in the invasion of salivary gland tumors. 【Methods】The expression of EMMPRIN and MVD were examined in 28 cases of pleomorphic adenoma (PA), 25 cases of mucoepidermoid carcinoma (MC), 33 cases of adenoid cystic carcinoma (ACC) as well as 9 cases of normal salivary glands as comparison control by immunochemistry SP method. 【Results】The positive rate of EMMPRIN expression in normal salivary gland, PA, MC, and ACC were 1/9, 54%, 84%, and 91%, respectively. Significant differences were found among them. Significant differences were found in MVD of 4 groups of the specimens. The MVDs of MC and ACC were significantly higher than that in PA. The MVD of the EMMPRIN-positive group was significantly higher than that in the EMMPRIN-negative group. 【Conclusions】In salivary gland tumours, EMMPRIN makes differences by endowing them with corresponding invading behavior and malignant potential via stimulating MMPs production and angiogenesis. EMMPRIN and MVD can be considered as biological markers for invading behavior in salivary gland tumours.

**Key words:** salivary gland tumor; matrix metalloproteinases; extracellular matrix metalloproteinase inducer; microvessel density; invasion

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2008,29(1):51-54,58]

收稿日期:2007-09-25

基金项目:广东省科技计划项目(2006B36001002);广东省自然科学基金(7001593)

作者简介:黄志权(1978-),男,广西柳州人,主治医师;李劲松,副教授,硕士生导师,通讯作者,Email:zhiquanhuang1978@126.com

涎腺肿瘤是涎腺组织最常见的疾病,其病理类型众多,生物学行为各异<sup>[1]</sup>。研究认为,基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)在涎腺恶性肿瘤中的表达差异是使不同涎腺肿瘤具有不同侵袭能力的重要原因<sup>[2,3]</sup>。同时涎腺肿瘤 MMPs 的表达与微血管密度(microvessel density, MVD)存在明显相关性, MMPs 通过促进肿瘤血管的形成来促进涎腺肿瘤的侵袭<sup>[4]</sup>。细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)作为 MMPs 的诱导因子已被证实多种恶性肿瘤组织中刺激 MMPs 的生成,从而促进恶性肿瘤的侵袭<sup>[5]</sup>。本研究通过对涎腺常见肿瘤 EMMPRIN 的表达和 MVD 进行研究,探讨 EMMPRIN 和 MVD 对涎腺肿瘤侵袭性的生物学行为作用机理。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

选取中山大学附属第二医院口腔颌面外科 1998 年 1 月至 2005 年 9 月间手术切除的部分涎腺肿瘤组织标本,其中包括多形性腺瘤(pleomorphic adenoma, PA)28 例,黏液表皮样癌(mucoepidermoid carcinoma, MC)25 例,腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)33 例;并选取同期 9 例需手术切除的正常涎腺组织作为对照。病变发生于腮腺、颌下腺、舌下腺及上腭、口底、颊部的小涎腺组织。所有病例均为首发病例,术前均未行放射治疗和化学治疗及其它相关的抗肿瘤治疗。

### 1.2 免疫组织化学方法

采用 SP 免疫组织化学方法, DAB 染色。EMMPRIN 兔抗人多克隆抗体、CD34 鼠抗人单克隆抗体(QBEnd/10)、S-P 试剂盒(即用型)及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。将实验标本进行组织切片,厚 4  $\mu\text{m}$ ,分别进行 HE 染色和免疫组化染色。EMMPRIN 抗原修复采用 EDTA 水浴法, CD34 染色采用微波炉加热法。EMMPRIN 和 CD34 均用 PBS 代替一抗作阴性对照,用已知肝细胞癌切片作阳性对照。

### 1.3 结果判断

EMMPRIN 阳性结果判断,细胞的胞浆或胞膜显示棕色颗粒者为阳性;CD34 阳性信号位于细胞质中,呈棕黄色<sup>[6]</sup>。任何被 CD34 抗体染成棕黄色

孤立的内皮细胞或内皮细胞簇团,只要与临近微血管的肿瘤细胞或其它结缔组织分开,便将其作为一个微血管。按 Weider 法进行 MVD 计数<sup>[7]</sup>:先在低倍镜下扫视整个切片区寻找微血管高密度区即热点,然后在 200 倍光镜下计数被染成棕色的血管内皮细胞簇,结果用 3 个 200 倍视野下微血管数目的平均数来表示。

### 1.4 统计学方法

采用  $\chi^2$  检验(chi-square test)或确切概率法(Fisher's exact test)比较两组或多组之间阳性率的差别;分别采用 *t* 检验(*t*-test)和单因素方差分析(one-way ANOVA)进行两组与多组之间样本均数的比较。全部资料的统计分析均采用 SPSS10.0 统计软件包于电脑上完成。取  $\alpha=0.05$  水平,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EMMPRIN 在正常涎腺组织和涎腺肿瘤组织中的表达

9 例正常涎腺组织中,EMMPRIN 阳性表达 1 例,阳性率为 1/9(图 1A);28 例涎腺多形性腺瘤中,EMMPRIN 阳性表达 15 例,阳性率为 54%(图 1B);25 例黏液表皮样癌中,EMMPRIN 阳性表达 21 例,阳性率为 84%(图 1C);33 例腺样囊性癌中,EMMPRIN 阳性表达 30 例,阳性率为 91%(图 1D,表 1)。多形性腺瘤 EMMPRIN 表达的阳性率高于正常涎腺组织( $P=0.03$ );黏液表皮样癌 EMMPRIN 表达的阳性率高于多形性腺瘤( $P=0.02$ );腺样囊性癌 EMMPRIN 表达的阳性率高于多形性腺瘤( $P=0.00$ );腺样囊性癌 EMMPRIN 表达的阳性率高于黏液表皮样癌( $P=0.42$ )。

表 1 涎腺组织及涎腺肿瘤组织中 EMMPRIN 的表达  
Table 1 The expression of EMMPRIN in normal salivary gland and salivary gland tumor

Type	EMMPRIN positive	EMMPRIN negative	Positive rate
Normal salivary gland	1	8	1/9
PA	15	13	54%
MC	21	4	84%
ACC	30	3	91%

EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer; PA: pleomorphic adenoma; MC: mucoepidermoid carcinoma; ACC: adenoid cystic carcinoma; chi-square test:  $\chi^2=27.69$ ,  $P=0.00$

## 2.2 涎腺正常组织及涎腺肿瘤组织 MVD 计数 (CD34 表达)

涎腺正常组织、多形性腺瘤、黏液表皮样癌和腺样囊性癌组织中均有 CD34 的表达(图 2)。9 例涎腺正常组织的 MVD 值为  $44 \pm 6$ , 28 例涎腺多形性腺瘤组织的 MVD 值为  $19 \pm 11$ , 25 例涎腺黏液表皮样癌组织的 MVD 值为  $27 \pm 12$ , 33 例涎腺腺样囊性

癌组织的 MVD 值为  $25 \pm 10$ 。经单因素方差分析, 四组样本间的 MVD 值差异具有统计学意义 ( $F=10.03$ ,  $P=0.00$ )。黏液表皮样癌的 MVD 值高于多形性腺瘤 ( $P=0.00$ )。腺样囊性癌的 MVD 值高于多形性腺瘤 ( $P=0.01$ )。黏液表皮样癌的 MVD 值高于腺样囊性癌 ( $P=0.22$ )。正常涎腺组织中的 MVD 值高于多形性腺瘤、黏液表皮样癌、腺样囊性癌 ( $P=0.00$ )。

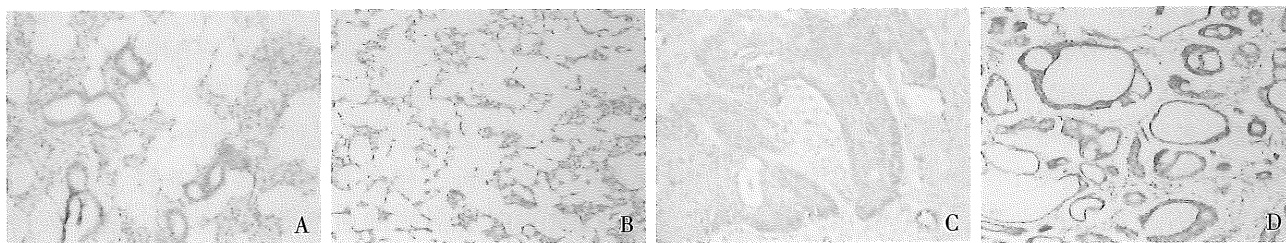


图 1 涎腺组织中 EMMPRIN 阳性表达

Fig.1 Positive EMMPRIN expression in tissue of salivary gland

EMMPRIN: extracellular matrix metalloproteinase inducer

A: normal salivary gland; B: pleomorphic adenoma; C: mucoepidermoid carcinoma; D: adenoid cystic carcinoma;  $\times 200$

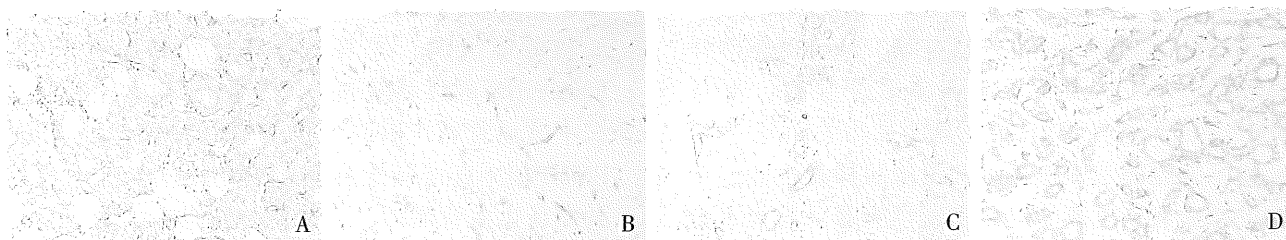


图 2 涎腺组织中 CD34 阳性表达

Fig.2 Positive CD34 expression in tissue of salivary gland

A: normal salivary gland; B: pleomorphic adenoma; C: mucoepidermoid carcinoma; D: adenoid cystic carcinoma;  $\times 200$

## 2.3 EMMPRIN 表达阳性和阴性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 计数

本实验组中 66 例 EMMPRIN 表达阳性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值为  $25 \pm 11$ , 20 例 EMMPRIN 表达阴性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值为  $19 \pm 8$ , EMMPRIN 表达阳性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值高于 EMMPRIN 表达阴性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值, 经统计学检验, 差异具有统计学意义 ( $t=2.06$ ,  $P=0.04$ )。

## 3 讨论

涎腺肿瘤是涎腺组织最常见的疾病, 其病理类型众多, 生物学行为各异<sup>[1]</sup>。基质金属蛋白酶 (MMPs) 的高表达及其与基质金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitors of metalloproteinases, TIMPs)

平衡失调在涎腺肿瘤侵袭性生长中发挥重要作用<sup>[2,3]</sup>。Nagel 等<sup>[8]</sup>研究证明, 在涎腺肿瘤中, 恶性肿瘤的 MMPs 表达明显强于良性肿瘤, 并且恶性肿瘤中 MMPs/TIMPs 的比值高于良性肿瘤。MMPs 能破坏细胞外基质的降解平衡, 促进癌细胞突破基底膜和细胞外基质的组织学屏障, 形成对邻近组织的侵袭<sup>[9]</sup>。同时 MMPs 促进涎腺肿瘤间质血管的生成来加速肿瘤的生长和侵袭<sup>[4]</sup>。细胞外基质金属蛋白酶诱导因子 (extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN) 通过刺激 MMPs 的生成而促进肿瘤的侵袭<sup>[5]</sup>。

本研究显示在 EMMPRIN 在正常涎腺组织、多形性腺瘤、黏液表皮样癌、腺样囊性癌的表达阳性率依次增高, 并且 EMMPRIN 在上述 3 种肿瘤组织中表达差异与既往对涎腺肿瘤的研究中 MMPs 的表达差异及 MMPs/TIMPs 的比值差异具有一致

性<sup>[2,3,8]</sup>,提示作为 MMPs 诱导因子的 EMMPRIN 通过刺激 MMPs 表达升高而使 MMPs/TIMPs 的比值上升,打破细胞外基质生成和降解间的平衡,使恶性肿瘤组织中基底膜和细胞外基质的降解明显高于良性肿瘤,促使黏液表皮样癌和腺样囊性癌表现出较多形性腺瘤更强的侵袭性,这与二者的临床侵袭性的生物学特性差异相一致。而多形性腺瘤中 EMMPRIN 的表达阳性率高于涎腺正常组织,说明相对于正常涎腺组织,涎腺多形性腺瘤具有更强的产生 EMMPRIN 的能力,提示 EMMPRIN 在涎腺多形性腺瘤中的表达与多形性腺瘤的侵袭性的生物学行为相关。涎腺正常组织中尚有 1 例 EMMPRIN 呈阳性表达,提示 EMMPRIN 也有可能参与涎腺正常条件下的某些生理过程,这尚有待于进一步研究。

肿瘤的生长和侵袭有赖于新生血管的形成。研究表明微血管密度与肿瘤的生长、侵袭、转移密切相关,并可作为肿瘤微血管形成程度和肿瘤生物学特征判断指标<sup>[10]</sup>。既往研究认为涎腺腺样囊性癌中 MVD 值高于涎腺多形性腺瘤,并且 MMP-2 的表达与 MVD 值呈现明显相关性<sup>[4]</sup>。本研究显示涎腺黏液表皮样癌和涎腺腺样囊性癌组织中的微血管密度高于涎腺多形性腺瘤,与大多数实体肿瘤研究结果一致,即同一组织中发生的肿瘤恶性程度越高,其 MVD 值越高。由此可见,在涎腺良恶性肿瘤的 MVD 值是与其临床侵袭性的生物学行为相适应的。而涎腺正常组织分别与涎腺多形性腺瘤和涎腺恶性肿瘤相比,其微血管密度明显升高。对此,既往研究未见报道,我们认为这可能与组织类型有关。正常涎腺组织主要是腺泡结构,相应的肿瘤应为腺泡细胞癌,因此认为正常涎腺组织 MVD 值应与腺泡细胞癌比较方有意义。而多形性腺瘤、黏液表皮样癌和腺样囊性癌起源于导管或闰管细胞,组织来源不同。同时涎腺正常组织的腺泡结构属于功能活跃的外分泌腺,长期处于分泌唾液的功能活跃状态,必须有足够的血管提供营养支持涎腺的高代谢状态,这有可能是 MVD 值较高的原因。对涎腺正常组织的 MVD 值尚需进一步研究。

研究提示, MMPs 促进涎腺肿瘤间质血管的生成来加速肿瘤的生长和侵袭<sup>[4]</sup>。本研究将 EMMPRIN 表达阳性的涎腺肿瘤组织和 EMMPRIN 表达阴性的涎腺肿瘤组织的 MVD 值进行比较,

EMMPRIN 表达阳性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值高于 EMMPRIN 表达阴性的涎腺肿瘤组织中的 MVD 值。Tang 等<sup>[11]</sup>在对乳腺癌的研究发现,在 RNA 水平和蛋白质水平改变 EMMPRIN 的表达均会直接影响血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的产生,阻断 EMMPRIN 的表达能使 VEGF 的表达下调;研究还发现 EMMPRIN 及其诱导产生的 MMPs 均直接介导 VEGF 的产生。因此认为肿瘤细胞产生的 EMMPRIN 通过介导肿瘤组织和基质的相互作用直接促进 VEGF 和 MMPs 的产生,进而促进肿瘤血管的生成,为肿瘤组织的生长、侵袭提供必要的条件,并指出 EMMPRIN 在肿瘤的血管形成和生长过程中发挥关键性作用。涎腺肿瘤中 EMMPRIN 与 MVD 的相关性研究尚未见报道。现有的研究认为涎腺腺样囊性癌和多形性腺瘤中, MMP-2 的表达和 MVD 呈正相关, MMP-2 通过促进肿瘤间质血管的生成来加速肿瘤的侵袭和转移<sup>[4]</sup>。本研究结果提示在涎腺肿瘤组织,尤其是涎腺恶性肿瘤组织中, EMMPRIN 通过刺激 MMPs 的生成,从而使肿瘤组织中微血管密度升高,即 MVD 值的上升;同时 EMMPRIN 直接刺激肿瘤组织中 VEGF 的生成使肿瘤新生血管增加,从而使肿瘤组织中微血管密度升高,即 MVD 值的上升。可以认为 EMMPRIN 在涎腺肿瘤的侵袭性和恶性潜能方面的作用机制,部分是由于促进 MMPs 和 VEGF 的生成,进而促进肿瘤微血管的形成而实现的。

综上所述, EMMPRIN 通过刺激 MMPs 和肿瘤血管的生成,使不同的涎腺肿瘤具有相应的侵袭性和恶性潜能。EMMPRIN 和 MVD 可以作为判断涎腺肿瘤侵袭性的重要指标。

#### 参考文献:

- [1] 马大权主编. 涎腺疾病 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002:211-239.
- [2] 陈宇,田鲲,耿宁,等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂在涎腺多形性腺瘤生物学行为中的意义 [J]. 中华口腔医学杂志, 2005,40(1):58-61.
- [3] 田鲲,陈宇,耿宁,等. 基质金属蛋白酶及其组织抑制剂表达失衡与涎腺恶性肿瘤浸润生长的关系 [J]. 华西口腔医学杂志, 2005,23(4):273-276.
- [4] 张旭,何伟,张兰,等. 涎腺多形性腺瘤与腺样囊性癌中 MMP-2 的表达与 MVD 的关系 [J]. 河南肿