

基质金属蛋白酶-2,9及其抑制剂在骨肉瘤中表达的意义

彭挺生, 丘钜世, 吴惠茜, 梁惠珍, 钟觉民
(中山大学中山医学院病理学教研室, 广东 广州 510080)

摘要:【目的】探讨基质金属蛋白酶-2,9(MMP-2,9)及其特异性抑制剂TIMP-2,1在骨肉瘤中的表达情况及其与骨肉瘤侵袭、转移、复发的关系。【方法】采用免疫组织化学链酶菌抗生物素-过氧化酶(SP)法检测了62例骨肉瘤(初发性骨肉瘤51例、复发性骨肉瘤11例,确诊时即伴有肺转移者9例、不伴有肺转移者53例)和正常对照组织中MMP-9、MMP-2、TIMP-1、TIMP-2的表达,并根据阳性瘤细胞占肿瘤细胞总数的比率进行半定量分析和非参数检验。【结果】MMP-9、TIMP-1在骨肉瘤中的阳性表达率分别为76%、18%,与二者在正常对照组织中的阳性率相比,MMP-9表达明显升高,TIMP-1表达明显降低(P 均 <0.01)。MMP-2、TIMP-2在骨肉瘤中的阳性表达率分别为69%、52%,与二者在正常对照组织中的阳性率相比差异无显著性(P 均 >0.05)。MMP-9在肿瘤细胞的胞浆及胞膜中均有表达,且在肿瘤的侵袭边缘阳性细胞数目较多,染色强度较高。MMP-2,9及TIMP-1,2在初发性和复发性骨肉瘤之间以及在伴有肺转移和不伴有肺转移的骨肉瘤之间的表达差异无显著性。Spearman相关分析表明骨肉瘤中MMP-9与MMP-2、MMP-2与TIMP-2以及TIMP-1与TIMP-2之间的表达均显著性相关。【结论】骨肉瘤组织中MMP-9表达升高、TIMP-1表达降低,二者协同促进肿瘤细胞的生长和局部的侵袭破坏。骨肉瘤术后是否复发与是否出现早期转移与MMP-2,9和TIMP-1,2无关。

关键词:骨肉瘤; 肿瘤浸润; 肿瘤转移; 金属蛋白酶类; 金属蛋白酶类抑制剂

中图分类号:R738

文献标识码:A

文章编号:1000-257X(2003)02-0132-04

The Expression and Significance of Matrix Metalloproteinase-2, 9 and their Inhibitors in Osteosarcoma

PENG Ting-sheng, QIU Ju-shi, WU Hui-xi, LIANG Hui-zhen, ZHONG Jue-min

(Department of Pathology, Zhongshan Medical College, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510080, China)

Abstract:【Objective】To investigate the expression of matrix metalloproteinase-2, 9(MMP-2, 9) and their inhibitors (tissue inhibitor of metalloproteinase, TIMP)-1, 2 in osteosarcoma, and the relationship between them and the invasion, metastasis and recurrence rate of the tumor. 【Methods】Immunohistochemistry staining (labeled streptavidin method) was used to detect MMP-2, 9, TIMP-1, 2 in 62 cases of osteosarcoma (51 cases of primary tumors and 11 cases of recurrent tumors, 9 cases with lung metastasis and 53 cases without lung metastasis), and normal connective tissues were used as negative control. According to the rate of the positive tumor cells, the results were semi-quantitated and analyzed by using non-parameter rank test. 【Results】The positive rates of MMP-9 and TIMP-1 were 76% and 18% respectively, and there were significant difference of the two factors between osteosarcoma and negative control tissue ($P < 0.01$). MMP-9 positive signal appeared in tumor cells' cytoplasm and membrane, and MMP-9 exhibited strong immunoactivity in cells located in tumor margins. There were no significant difference of MMP-2 and TIMP-2 between osteosarcoma and normal tissues ($P > 0.05$). There were also no significant difference of MMP-2, 9 and TIMP-1, 2 between primary and recurrent osteosarcoma or between osteosarcoma with lung metastasis and without lung metastasis. There were significant correlation in osteosarcoma between MMP-2 and MMP-9, and between MMP-2 and TIMP-2, and between

收稿日期:2002-05-23

基金项目:中山医科大学“211工程”重点学科基金资助项目(98028)

作者简介:彭挺生(1973-),女,广东化州人,在职博士生,讲师;丘钜世,教授,博士生导师。

TIMP-1 and TIMP-2. 【Conclusion】 Increase of MMP-9 and decrease of TIMP-1 are involved in tumor growth and invasion of osteosarcoma. The recurrence rate and early lung metastasis are not affected by the expression of MMP-2, 9 and TIMP-1, 2.

Key words: osteosarcoma; neoplasm Invas/iveness; neoplasm metastasis; metalloproteinases; tissue-inhibitors of metalloproteinases

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2003, 24(2): 132 ~ 135]

恶性肿瘤细胞的重要生物学特性是其对周围组织的侵袭和破坏,并在远隔器官形成转移灶,这是一个多环节、多步骤的复杂过程,其中细胞外基质中的蛋白水解酶类产生重要的促进侵袭转移的作用;基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinase, MMPs)是细胞外蛋白水解酶类中的一种,在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要的作用。我们应用免疫组化方法,检测了 62 例骨肉瘤组织中 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 的表达,探讨它们与骨肉瘤的侵袭性、复发性及肺转移能力之间的关系。

1 材料与方 法

1.1 临床资料

材料选自本教研室 1995 年 7 月至 2001 年 10 月骨肉瘤手术切除标本,病例的发病年龄 9~49 岁,中位年龄 17 岁;术后复发时间最长 3 年,最短者仅为 5 个月,且伴有肺转移灶的形成;标本经常规中性福尔马林固定,石蜡包埋,重染 HE 复查。共收集初发性骨肉瘤 51 例(其中骨母细胞为主型 35 例,纤维母细胞为主型 10 例,软骨母细胞为主型 6 例),复发性骨肉瘤 11 例;确诊时即伴有肺转移的骨肉瘤 9 例,不伴有肺转移者 53 例。采用肿瘤旁正常纤维结缔组织作为对照。免疫组织化学 MMP-2、MMP-9、TIMP-1、TIMP-2 单克隆抗体和链霉菌抗生物素-过氧化酶(SP)试剂盒购自福州迈新公司(试剂编号分别为: MAB-0244, -0245, -0282, -0283)。

1.2 方 法

用链霉菌抗生物素-过氧化酶(SP)法检测, MMP-9 抗原修复采用枸橼酸盐高压加热法(pH6.0), TIMP-1 抗原修复采用枸橼酸盐微波加热法(pH6.0),一抗工作浓度均为 1:50; MMP-2、TIMP-2 抗原修复采用 EDTA 高压加热法(pH8.0),一抗工作浓度均为 1:200;每次均设阳性、阴性对照。

染色结果判断标准: MMP-9、MMP-2、TIMP-2 染色阳性信号主要位于肿瘤细胞的胞浆内,呈棕褐色颗粒,根据阳性细胞所占比例不同分为以下几个级别: (-)瘤细胞染色阴性或<5%的瘤细胞有少量着色; (+)5%~20%的瘤细胞呈弱阳性; (++)21%~50%的瘤细胞阳性; (+++) >50%的瘤细胞阳性且着色程度较强。TIMP-1 在骨肉瘤组织中的阳性率很低,与正常组织交界处的肿瘤细胞的胞浆内有棕黄色颗粒出现,肿瘤细胞染色阴性或<5%的瘤细胞有少量着色定为(-), >5%的瘤细胞阳性定为(+)。周围正常组织中的部分单核细胞,纤维母细胞及血管壁平滑肌细胞的胞浆也有一定程度的表达,根据阳性细胞的比例分为以下几个级别: (-)细胞染色阴性或<5%的细胞有少量着色; (+)5%~20%的细胞呈阳性; (++)21%~50%的细胞呈阳性; (+++) >50%的细胞呈阳性。

1.3 统计学分析

应用 SPSS 统计软件包,方法采用 Mann-Whitney 检验与 Spearman 等级相关分析。

2 结 果

2.1 MMP-9 和 TIMP-1 的免疫组化结果

MMP-9 蛋白在骨肉瘤组织中位于肿瘤细胞的胞浆(图 1),在肿瘤组织与正常组织交界处阳性细胞密度较高,且染色程度较强; TIMP-1 在骨肉瘤组织中的表达水平很低,仅在肿瘤组织与正常组织交界处有少数肿瘤细胞的胞浆内有棕黄色颗粒出现,且染色程度较弱(图 2)。MMP-9 和 TIMP-1 在肿瘤周围正常的单核细胞、纤维母细胞及血管壁平滑肌细胞中均有一定程度的表达(表 1)。

2.2 MMP-2 和 TIMP-2 的免疫组化结果

MMP-2 和 TIMP-2 蛋白在骨肉瘤组织中位于肿瘤细胞的胞浆(图 3, 4),二者在肿瘤周围正常的单核细胞、纤维母细胞及血管壁平滑肌细胞中均有一定程度的表达,见表 2。

表 1 MMP-9 和 TIMP-1 在骨肉瘤组织及正常对照组织中的表达及其与病理的关系

Table 1 The expression of MMP-9 and TIMP-1, and the relationship between them and some pathological characteristics in osteosarcoma and normal control tissues

Characteristic	Total	MMP-9				Positive rate(%)	P	TIMP-1		Positive rate(%)	P
		-	+	++	+++			-	+		
Normal control tissue	18	9	7	2	0	50		2	16	89	
Osteosarcoma	62	15	9	22	16	76	<0.01 ¹⁾	51	11	18	<0.01 ¹⁾
Primary	51	12	9	21	9	77		41	10	20	
Recurrence	11	3	0	1	7	73	>0.05 ²⁾	10	1	9	>0.05 ²⁾
With lung metastasis	9	1	1	2	5	89		8	1	11	
Without lung metastasis	53	14	8	20	11	74	>0.05 ³⁾	43	10	20	>0.05 ³⁾

1) Osteosarcoma vs normal tissue, 2) Primary osteosarcoma vs recurrent osteosarcoma, 3) Osteosarcoma with lung metastasis vs osteosarcoma without lung metastasis

表 2 MMP-2 和 TIMP-2 在骨肉瘤组织及正常对照组织中的表达及其与病理的关系

Table 2 The expression of MMP-2 and TIMP-2, and the relationship between them and some pathological characteristics in osteosarcoma and normal control tissues

Characteristic	Total	MMP-2				Positive rate(%)	P	TIMP-2				Positive rate(%)	P
		-	+	++	+++			-	+	++	+++		
Normal control tissue	18	7	9	2	0	61		8	8	2	0	56	
Osteosarcoma	62	19	19	17	7	70	>0.05 ¹⁾	30	14	13	5	52	>0.05 ¹⁾
Primary	51	18	15	12	6	65		24	14	10	3	53	
Recurrence	11	1	4	5	1	91	>0.05 ²⁾	6	0	3	2	46	>0.05 ²⁾
With lung metastasis	9	3	3	3	0	67		5	1	3	0	45	
Without lung metastasis	53	16	16	14	7	70	>0.05 ³⁾	25	13	10	5	53	>0.05 ³⁾

1) Osteosarcoma vs normal tissue, 2) Primary osteosarcoma vs recurrent osteosarcoma, 3) Osteosarcoma with lung metastasis vs osteosarcoma without lung metastasis

Spearman 等级相关分析表明在骨肉瘤组织中 MMP-2 和 TIMP-2 之间 ($r=0.695$, $P<0.01$)、MMP-2 和 MMP-9 之间 ($r=0.428$, $P<0.01$)、TIMP-1 和 TIMP-2 之间 ($r=0.399$, $P<0.01$) 均有显著性相关关系。

3 讨论

以往大量的研究表明, MMP-2 和 MMP-9 可在多种上皮性肿瘤中表达, 肿瘤细胞与间质细胞均可表达, 以肿瘤组织相对较高^[1]; 但是, 对骨肉瘤中 MMPs 表达情况的研究尚不多见。本研究发现骨肉瘤组织中 MMP-9 的表达显著高于周围正常组织, 提示骨肉瘤组织中 MMP-9 主要来源于肿瘤细胞,

并且可能参与促进骨肉瘤的局部侵袭。Hoffmann 等^[2]发现 MMP-2 在黑色素瘤的侵袭和转移中具有重要的作用; Bodey 等^[3]也认为 MMP-2 通过参与肿瘤内新生血管的形成而促进前列腺癌的生长和转移; 但是本组研究却未发现 MMP-2 在骨肉瘤组织的生长和局部侵袭中起主要作用。在结肠癌中活性 MMP-2 作用于 MMP-9, 后者在结肠癌中的表达减少, 却在转移性结肠癌细胞株中有表达^[4]; 另外在鼻咽癌中, 由膜潜伏蛋白(LMP-1)促进合成的 MMP-9 则有促进癌细胞转移的潜能^[5]; 但在本研究中, MMP-2, MMP-9 在术后复发和初发性骨肉瘤组织之间, 以及在伴有和不伴有肺转移的骨肉瘤之间的表达均无显著性差异, 表明 MMP-2, MMP-9 并非骨肉瘤复发和出现早期转移的影响因素。

TIMP 同样在肿瘤组织与间质细胞中均可表达。TIMP-1 以肿瘤细胞表达为主, TIMP-2 以间质细胞表达为主^[6]。TIMP 作为 MMP 的天然抑制物可下调 MMP 的活性, 对维持细胞外基质的稳态具有重要的作用; 以 TIMP-1 或 TIMP-2 基因转染 B16-F10 黑色素瘤细胞株、人胃癌细胞株、人星形细胞瘤细胞株以及 C-Ha-ras 转化的鼠胚细胞都可致侵袭和转移潜能下降; 而反义 TIMP-1 mRNA 转染鼠 3T3 细胞株, 可使侵袭人羊膜的能力和在裸鼠体内形成转移瘤的能力均有所增强。在本研究中, TIMP-1 在骨肉瘤中的表达显著低于在间质中的表达, 提示 TIMP-1 对骨肉瘤的生长和侵袭有抑制作用, 同时 MMP-9 在肿瘤组织中的水平显著升高, MMP-9 与 TIMP-1 比值的升高可能是影响骨肉瘤生长和局部侵袭的重要因素。TIMP-2 在骨肉瘤与间质中的表达没有显著性差异, 表明 TIMP-2 对骨肉瘤的生长和侵袭并无直接的抑制作用, 但相关性分析表明 MMP-9 与 MMP-2、MMP-2 与 TIMP-2、TIMP-1 与 TIMP-2 之间均存在显著性相关, 提示在骨肉瘤中存在 MMP 与 TIMP 之间的调控网络, MMP-2 和 TIMP-2 虽然没有直接影响骨肉瘤的生长, 但或许 MMP-9 是 MMP-2 的作用靶点, 与在结肠癌中的作用相似^[4]。本研究提示 TIMP-1 和 TIMP-2 与骨肉瘤的复发和是否转移均无关。Kido^[8]证明 MMP-9 mRNA 的过表达是鼠移植性骨肉瘤获得转移特性的必要条件, MMP-2 和 TIMP-1 在有转移潜能的移植性骨肉瘤中都无过表达, 与本研究结果基本一致。

(本文图 1~4 见插页 4. Fig. 1~4 shown in back colored page 4)

(上接第 120 页 from page 120)

OC 和 IGF- I 的含量亦高于对照血清组, 提示芪归合剂可直接促进成骨细胞的增殖、分化和矿化, 提高了成骨细胞形成新生骨质的能力。因此, 直接促进成骨细胞骨形成功能是芪归合剂能促进生长的另一作用机制, 这为进一步实验和临床治疗肾病综合征的生长障碍提供了依据。这两味药来源丰富、价格便宜、无毒副作用, 在临床上应有较广阔的应用前景。

参考文献:

- [1] 蒋小云, 陈述枚, 林穗珍, 等. 芪归合剂促进肾病综合征鼠肝 IGF- I、IGFBP-3 表达的研究 [J]. 中华儿科杂志, 2001, 39(9): 550.
- [2] 周明眉, 杨奎, 姜达平, 等. 中药血清药理学的方法

参考文献:

- [1] Garbett E A, Reed M W, Brown N J, *et al.* Proteolysis in human breast and colorectal cancer[J]. Br J Cancer, 1999, 81(2): 287.
- [2] Hoffmann U B, Westphal J R, Van Kraats A A, *et al.* Expression of integrin alpha(v) beta(3) correlates with activation of membrane-type matrix metalloproteinase (MT1-MMP) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human melanoma cells in vitro and in vivo[J]. Int J Cancer, 2000, 87(1): 12.
- [3] Bodey B, Bodey B J, Siegel S E, *et al.* Immunocytochemical detection of matrix metalloproteinase expression in prostate cancer[J]. In Vivo, 2001, 15(1): 65.
- [4] Collins H M, Morris T M, Watson S A. Spectrum of matrix metalloproteinase expression in primary and metastatic colon cancer: relationship to the tissue inhibitors of metalloproteinase and membrane type-1-matrix metalloproteinase[J]. Br J Cancer, 2001, 84(12): 1664.
- [5] Horikawa T, Yoshizaki T, Sheen T S, *et al.* Association of latent membrane protein 1 and matrix metalloproteinase 9 with metastasis in nasopharyngeal carcinoma[J]. Cancer, 2000, 89(4): 715.
- [6] 高庆, 吴秉铨. 基质金属蛋白酶与肿瘤侵袭和转移. 中华病理学杂志, 1998, 27(2): 155.
- [7] Kido A, Tsutsumi M, Iki M, *et al.* Overexpression of matrix metalloproteinase(MMP)-9 correlates with metastatic potency of spontaneous and 4-hydroxyaminoquinoline 1-Oxide (4-HAQO)-induced transplantable osteosarcoma in rats[J]. Cancer Lett, 1999, 137(2): 209.

(编辑 黄小延)

学研究 - 采血时间的确定及时效关系研究[J]. 中药药理与临床, 1999, 15(1): 43.

- [3] 凌启波. 实用病理特殊染色和组化技术[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1989. 246~250.
- [4] 谢举临, 利天增, 祁少海, 等. 积雪草甙对体外培养的成纤维细胞的作用[J]. 中山医科大学学报, 2001, 22(1): 41.
- [5] Iwama H, Amagaya S, Ogihara Y. Effect of shosai-koto a Japanese and Chinese herbal medicinal mixture, on the mitogenic activity of lipopolysaccharide: A new pharmacological testing method[J]. J Ethnopharmacol, 1987, 21(1): 45.
- [6] 张群象, 陈可冀. 血清药理学在中药及复方研究中应用的评价[J]. 中国中西医结合杂志, 1996, 16(3): 131.

(编辑 张恩健)

基质金属蛋白酶-2,9 及其抑制剂在骨肉瘤中表达的意义 (正文见第 132 页)

The Expression and Significance of Matrix Metalloproteinase - 2, 9 and their Inhibitors in Osteosarcoma (Text in page 132)

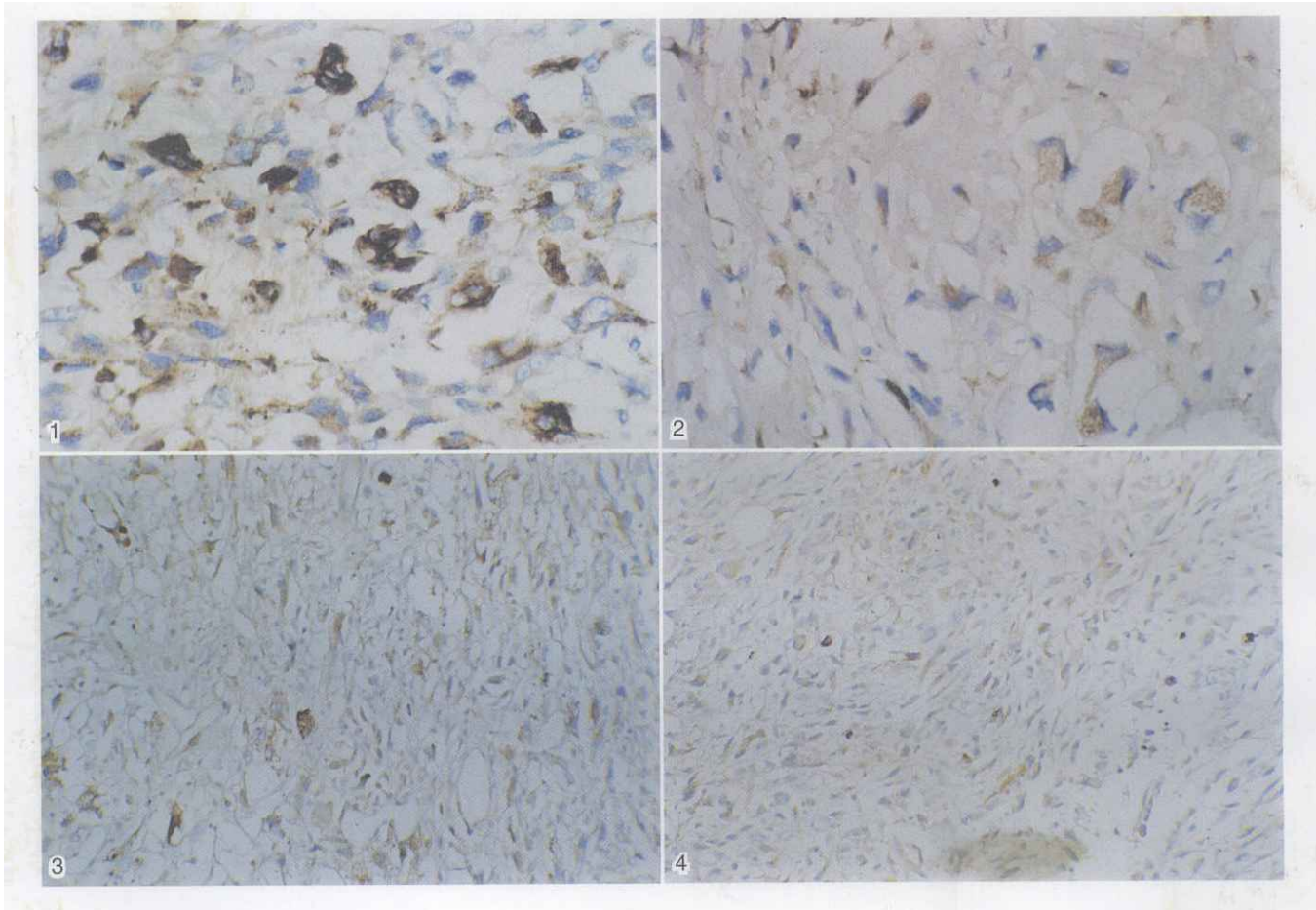


图 1 MMP-9 在骨肉瘤组织中的表达
图 2 TIMP-1 在骨肉瘤组织中的表达
图 3 MMP-2 在骨肉瘤组织中的表达
图 4 TIMP-2 在骨肉瘤组织中的表达
Fig. 1 The expression of MMP-9 in osteosarcoma (SP × 200)
Fig. 2 The expression of TIMP-1 in osteosarcoma (SP × 200)
Fig. 3 The expression of MMP-2 in osteosarcoma (SP × 100)
Fig. 4 The expression of TIMP-2 in osteosarcoma (SP × 100)