

# 基质金属蛋白酶在口腔黏膜癌变过程中的表达及临床意义

蔡华雄<sup>1</sup>, 潘朝斌<sup>1</sup>, 李海刚<sup>2</sup>, 叶剑涛<sup>1</sup>, 朱越广<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】观察基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和基质金属蛋白酶抑制因子-2(TIM P-2)在口腔黏膜白斑及其癌变组织中的表达, 推断 MMP 在白斑癌变过程中的作用。【方法】通过免疫组织化学的方法检测 22 例白斑, 7 例白斑癌变组织以及 14 例正常黏膜组织中 MMP-2、MMP-9 及 TIM P-2 表达的情况。【结果】白斑癌变组的 MMP-2、MMP-9 表达阳性率分别为 85.7%、100%, 均高于正常组 ( $P < 0.05$ ); 白斑组的 MMP-2 表达阳性率为 50.0%, 与正常组无显著性差别 ( $P > 0.05$ ), MMP-9 表达阳性率为 100%, 高于正常组 ( $P < 0.05$ ); 3 组间的 TIM P-2 表达无明显差异 ( $P > 0.05$ )。【结论】在口腔黏膜的癌变过程中, MMP-2 和 MMP-9 的表达随着癌变程度的发展而增加。

**关键词:** 黏膜白斑病, 口腔/病理学; 口腔肿瘤; 免疫组织化学; 金属蛋白酶类; 金属蛋白酶组织抑制剂

中图分类号: R739.85 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)06-0477-03

**Expression and Significance of Matrix Metalloproteinases in Carcinogenesis of Oral Mucosa** CAI Hua-xiong<sup>1</sup>, PAN Chao-bin<sup>1</sup>, LI Hai-gang<sup>2</sup>, YE Jian-tao<sup>1</sup>, ZHU Yue-guang<sup>1</sup>. (1. Department of Stomatology, 2. Department of Pathology, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

**Abstract** 【Objective】To investigate expression of matrix metalloproteinase-2(MMP-2), matrix metalloproteinase-9(MMP-9) and tissue inhibitors of metalloproteinase-2(TIM P-2) in oral leukoplakia (OLK) and oral squamous cell carcinoma (OSCC) and to determine the relationship between MMPs and carcinogenesis of oral mucosa. 【Methods】SP immunohistological staining was used to detect the expression of MMP-2, MMP-9 and TIM P-2 in 22 cases of OLK, 7 cases of OSCC and 14 cases of normal oral mucosa. 【Results】The expression of MMP-2 and MMP-9 in OSCC was higher than normal oral mucosa ( $P < 0.05$ ). The expression of MMP-9 in OLK was higher than normal oral mucosa ( $P < 0.05$ ). There was no statistically significance in the expression of TIM P-2 among the 3 groups. 【Conclusion】There was a close relationship with carcinogenesis of oral mucosa in the expression of MMP-2 and MMP-9.

**Key words:** leukoplakia/pathology; mouth neoplasm; immunohistochemistry; metalloproteinases; tissue inhibitor of metalloproteinases

基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 是一组锌离子依赖性内肽酶。因其能降解细胞外基质 (extracellular matrix, ECM) 和基底膜 (basement membrane, BM) 除多糖以外的所有成分, 是迄今为止发现的与肿瘤侵袭与转移关系最为密切的一类蛋白水解酶, 近年来已成为肿瘤侵袭、转移研究的热点<sup>[1]</sup>。口腔黏膜白斑是公认的癌前病变, 其癌变率约在 3%~5% 左右, 发病机制尚不十分清楚<sup>[2]</sup>。本研究采用 MMP-2、MMP-9 和金属蛋白酶组织抑制剂 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIM P-2) 的单克隆抗体检测白斑组织 22 例, 白斑癌变组织 7 例, 探讨 MMP 在白斑癌变过程中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1999 年 3 月至 2002 年 3 月经我院病理确诊的口腔黏膜白斑患者 22 例, 其中男性 15 例, 女性 7 例, 年龄最大 61 岁, 最小 43 岁。既往确诊为口腔黏膜白斑经我科长期追踪近期发展为鳞癌的患者 7 例, 其中男性 5 例, 女性 2 例, 年龄最大 67 岁, 最小 50 岁。人正常口腔黏膜组织 14 例为对照组。

### 1.2 方法

3 组均分别进行 MMP-2、MMP-9 及 TIM P-2 检测: MMP-2(A-Gel VC2) 鼠单克隆抗体、MMP-9 兔多克隆抗体、TIM P-2(2TMP04) 鼠单克隆抗体和 SP 试剂盒 (即用型) 均购自福州迈新公司。作 TIM P-2 染色的切片先行高温高压抗原修复。一抗的稀释度均为 1:50。其余步骤按 SP 法进行。二氨基联苯胺显色。以 PBS 代替一抗作阴性对照, 以人工流产的胎盘绒毛组织作阳性对照。

### 1.3 免疫组化结果判断

收稿日期: 2002-05-19

作者简介: 蔡华雄 (1965-), 男, 广东潮阳人, 硕士, 讲师。

镜下观察组织细胞胞浆出现棕黄色颗粒为阳性结果。高倍镜下取4个不同视野各计数200个细胞,按阳性细胞所占的百分率分为:(-)无阳性细胞,(+)阳性细胞小于30%,(++)阳性细胞30%~50%,(+++)阳性细胞大于50%。

#### 1.4 统计学分析

采用秩和检验(Mann-Whitney test 和 Kruskal-Wallis test)比较两组或多组等级变量间的差异,使用标准正态分布统计量  $Z$  确定  $P$  值。所有统计均在计算机上由 SPSS8.0 统计软件包进行。

## 2 结果

癌变组织、白斑组织及正常黏膜组织的 MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 免疫组织化学染色阳性标本中可见细胞的胞浆出现棕黄色颗粒(图1~4)。MMP-2、MMP-9 及 TIMP-2 的表达见表1。①MMP-2 的表达:正常组14例中有4例表达,阳性率28.6%;白斑组22例中有11例表达,阳性率50.0%;癌变组7例中有6例表达,阳性率85.7%。3组间经秩和检验(Kruskal-Wallis test)有显著性差别( $\chi^2=6.893, P=0.032$ ),进一步作3组间的两两比较(Mann-Whitney test),结果癌变组与正常组间( $Z=-2.665, P=0.008$ )有显著性差别,癌变组阳性率高于正常组,而白斑组与正常组间( $Z=-1.513, P=0.130$ )、癌变组与白斑组间( $Z=-1.500, P=0.134$ )无显著性差别。②MMP-9 的表达:正常组14例中有7例表达,阳性率50.0%;白斑组22例及癌变组7例全部表达,阳性率均为100%。3组间经秩和检验(Kruskal-Wallis test)有显著性差别( $\chi^2=9.225, P=0.010$ ),进一步作3组间的两两比较(Mann-Whitney test),结果癌变组与正常组间( $Z=-2.496, P=0.013$ )、白斑组与正常组间( $Z=-2.418, P=0.016$ )有显著性差别,癌变组及白斑组的阳性率均高于正常组,而癌变组与白斑组间( $Z=-1.352, P=0.177$ )无明显差别。③TIMP-2 的表达:正常组14例中有11例表达,阳性率78.6%;白斑组22例中有11例表达,阳性率50.0%;癌变组7例中有3例表达,阳性率42.9%。3组间经秩和检验(Kruskal-Wallis test)无显著性差别( $\chi^2=0.501, P=0.779$ )。

## 3 讨论

肿瘤的侵袭和转移过程是瘤细胞从原发瘤脱

表1 3组标本MMP-2、MMP-9及TIMP-2的表达情况  
Table 1 Expression of MMP-2, MMP-9 and TIMP-2 among the 3 groups

	Normal oral mucosa	OLK	OSCC	<i>n</i>
MMP-2				
-	10	11	1	
+	4	7	4	
++	0	3	1	
+++	0	1	1	
MMP-9				
-	7	0	0	
+	0	4	0	
++	4	8	2	
+++	3	10	5	
TIMP-2				
-	3	11	4	
+	5	7	0	
++	5	4	3	
+++	1	0	0	

离后向周围和远处组织侵袭和转移的过程,涉及瘤细胞穿过细胞外基质(ECM)屏障、血管壁的基底膜等天然屏障的过程。大量实验证明瘤细胞侵袭转移能力与其诱导产生基质金属蛋白酶降解ECM、基底膜的能力密切相关<sup>[1,3]</sup>。基底膜中的IV型胶原为具有独特螺旋结构的蛋白质,大部分的蛋白酶对IV型胶原无降解作用,而IV型胶原酶则可以降解IV、V型胶原、层粘连蛋白等成分,破坏基底膜的完整性。IV型胶原酶有两种分子类型:相对分子质量为72 000的MMP-2和92 000的MMP-9,来源于结缔组织细胞和肿瘤细胞,在肿瘤侵袭和转移的过程中以MMP-2尤为重要<sup>[4-6]</sup>。

口腔黏膜白斑是公认的癌前病变,从正常口腔黏膜组织发展到白斑再到癌变的过程,是口腔肿瘤特别是口腔鳞癌演变的重要途径,其机制尚不十分清楚。有报道认为在增生或发育不良的口腔黏膜处仅能检出极少量的MMP-1<sup>[7]</sup>;另外的研究认为在癌前病变组织中尽管MMP的表达较弱,但毕竟是增加的<sup>[8]</sup>。本组研究表明,白斑癌变组的MMP-2、MMP-9表达阳性率明显高于正常对照组,而白斑组的MMP-2的表达阳性率增加不明显,只有MMP-9的表达增加,白斑癌变组与白斑组相比,两组间的MMP-2、MMP-9表达差异均不明显,说明

MMP 在黏膜癌变过程中的表达是逐渐增加的, 只有到了癌变阶段才与正常黏膜组织有了明显的不同, 表现为从量变到质变的过程, 其中 MMP-2 的表达与白斑的癌变关系更为密切, 提示由组织细胞产生的 MMP-2 可能对白斑的癌变起一定的促进作用。

基质金属蛋白酶组织抑制物 (TIMP) 是 MMP 的天然抑制剂, TIMP 与 MMP 之间的平衡关系在调节 ECM 的稳定状态中有重要作用, MMP 的分泌和活化并不一定能降解靶器官的 ECM 和 BM, 导致肿瘤发生, 因为宿主细胞和肿瘤细胞本身均可产生 TIMP, 抑制 MMP 的活性。TIMP-2 的相对分子质量为 20 000, 是 MMP-2、MMP-9 的天然抑制因子。研究发现, 外源性活化及重组的 TIMP 均能明显抑制肿瘤细胞侵袭和转移, 这主要通过抑制 MMP 的分泌及活性而起作用<sup>[9]</sup>。本组研究发现, 正常组、白斑组及白斑癌变组 3 组之间的 TIMP-2 的表达无显著性差异, 说明随着 MMP-2 和 MMP-9 表达的增加, TIMP-2 并没有同步增加, 两者的平衡无法保持, 导致癌变的发生。提示如果给予外源性 TIMP-2 或通过转染 TIMP-2 基因作基因治疗, 有可能增强白斑组织中的 TIMP-2 蛋白的表达及其对 MMP-2、MMP-9 的抑制作用, 阻断白斑向鳞癌的转化。

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

#### 参考文献:

- [1] 高庆, 吴秉铨. 基质金属蛋白酶与肿瘤侵袭和转移[J]. 中华病理学杂志, 1998; 27(2): 155.
- [2] 于世风. 口腔组织病理学[M]. 第4版. 北京: 人民卫生出版社, 2000. 155~157.
- [3] 张惠中, 张华, 李海刚, 等. 食管鳞癌基质金属蛋白酶及其抑制因子的表达及其意义[J]. 中山医科大学学报, 2000, 21(5): 352.
- [4] Poulsson R, Pignatelli M, Stetler-stenson W G, *et al.* Stromal expression of 72 kDa type IV collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNA in colorectal neoplasia[J]. *Am J Pathol*, 1992, 141(2): 389.
- [5] Satoh K, Ohtani H, Shimosegawa T, *et al.* Infrequent stromal expression of gelatinase A and intact basement membrane in intraductal neoplasms of the pancreas[J]. *Gastroenterology*, 1994, 107(5): 1488.
- [6] Kawmata H, Kameyama S, Kawai K, *et al.* Marked acceleration of the metastatic phenotype of a rat bladder carcinoma cell line by the expression of human gelatinase A[J]. *Int J Cancer*, 1995, 63(4): 568.
- [7] Birkedal-Hansen B, Pavelic Z P, Gluckman J L, *et al.* MMP and TIMP gene expression in head and neck squamous cell carcinomas and adjacent tissues[J]. *Oral Dis*, 2000, 6(6): 376.
- [8] Sutinen M, Kainulainen T, Hurskainen T, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases (MMP-1 and -2) and their inhibitors (TIMP-1, -2, and -3) in oral lichen, dysplasia squamous cell carcinoma and lymph node metastasis[J]. *Br J Cancer*, 1998, 77(12): 2239.
- [9] DeClerk Y A, Perez N, Shimada H, *et al.* Inhibition of invasion and metastasis in cells transfected with an inhibitor of metalloproteinases[J]. *Cancer Res*, 1992, 52(3): 701.

(编辑 刘清海)

## 疟蚊基因组图谱绘就

### 科学家认为该成果对防治疟疾具有“里程碑”意义

新华社电: 一个国际科学家小组近日宣布, 他们已绘制出向人类传播疟疾的最主要蚊子种类——冈比亚按蚊的基因组序列图谱, 这一成果有望用于研制防治疟疾的新式“武器”。

美国《科学》杂志和英国《自然》杂志 2002 年 10 月 2 日联合在华盛顿举行新闻发布会, 邀请有关科学家介绍了冈比亚按蚊基因组草图的测定及初步分析结果, 该研究正式发表于 10 月 4 日出版的新一期《科学》杂志。另外, 科学家们在新闻发布会上还宣布, 该周出版的《自然》也将刊登其他研究小组绘出的疟疾寄生虫——恶性疟原虫基因组草图的研究论文。这两项成果互为辉映, 被科学家们称之为疟疾研究领域的“里程碑”。世界卫生组织的一份声明认为, 这两项成果标志着“全球公共卫生”领域的一个“转折点”。

疟疾这一古老的传染病如今仍在威胁人类。据统计, 全球每年有 5 亿人感染疟疾, 近 300 万人因此死亡, 其中 90% 发生在非洲撒哈拉以南地区。蚊子会通过叮咬、吸血将疟疾寄生虫传播给人, 科学家们形象地比喻说, 在疟疾传播过程中, 蚊子是“枪”, 寄生虫是“子弹”, 而人是“牺牲品”。人类基因组草图已绘就, 恶性疟原虫这一最厉害的疟疾寄生虫及其最主要传播渠道——冈比亚按蚊的基因密码如今也被破译, 意味着科学家们获得了完整研究疟疾传播周期的所有遗传信息。专家们认为, 这无疑将为战胜疟疾提供前所未有的机遇。这项研究的负责人、美国塞莱拉公司的霍尔特指出, 通过识别与蚊子对杀虫剂的抵抗力有关的基因, 有可能为研制新的、更有效的杀虫剂提供靶标。如能识别出决定冈比亚按蚊为什么喜欢叮咬人的基因, 也有可能用于开发新型驱蚊剂。新一期《科学》杂志除刊登霍尔特小组的研究结果外, 还将发表十几篇相关研究论文、报告和评论分析性文章, 从多个角度探讨了蚊子基因组信息在疟疾防治领域的可能用途。

(毛磊)

基质金属蛋白酶在口腔黏膜癌变过程中的表达及临床意义 (正文见第 477 页)

Expression and Significance of Matrix Metalloproteinases in Carcinogenesis of Oral Mucosa (Text in page 477)

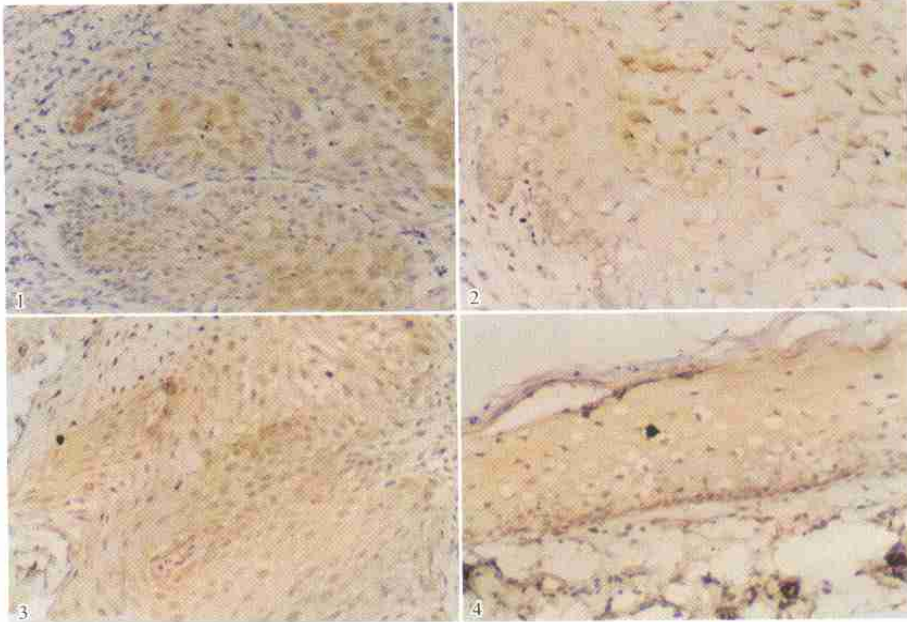


图 1 白斑癌变组织 MMP-2 免疫组织化学染色呈阳性(棕黄色) × 100

图 2 白斑组织 MMP-9 免疫组织化学染色呈阳性(棕黄色) × 100

图 3 白斑组织中 TIMP-2 免疫组织化学染色呈阳性(棕黄色) × 100

图 4 正常黏膜组织中 TIMP-2 免疫组织化学染色呈阳性(棕黄色) × 100

Fig. 1 Expression of MMP-2 in OSCC

Fig. 2 Expression of MMP-9 in OLK

Fig. 3 Expression of TIMP-2 in OLK

Fig. 4 Expression of TIMP-2 in normal oral mucosa

1 例遗传性乳光牙本质的金瓷体修复效果观察及家系调查 (正文见第 S3 页)

Therapeutic Efficacy of Ceramometal Restorations on Hereditary Dentinogenesis Imperfecta Type II and Pedigree Investigation (Text in page S3)



图 1 乳光牙本质患者修复前

图 3 乳光牙本质患者修复后

图 4 乳光牙本质患者修复 8 年后

Fig. 1 Before treatment of the patient with DI- II

Fig. 3 After ceramometal restoration of the patient with DI- II

Fig. 4 After ceramometal restoration for eight years of the patient with DI- II