

肿瘤诊断与基因治疗

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2014.01.008

MGMT 和 MMP-7 在星形细胞瘤中表达及临床意义

苏 康¹, 周志宇², 李国成³, 莫秋荣¹, 温 伟¹

(1. 广西壮族自治区民族医院病理科, 南宁 530001; 2. 广西壮族自治区民族医院神经外科, 南宁 530001;

3. 广西脑科医院神经外科, 柳州 545005)

【摘要】目的:研究星形细胞瘤组织中甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)和基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)基因蛋白的表达和意义。**方法:**应用免疫组化 SP 法检测 49 例星形细胞瘤中 MGMT 和 MMP-7 基因蛋白的表达。**结果:**MGMT、MMP-7 蛋白在星形细胞瘤中的表达率分别为 55.10%(27/49)和 51.02%(25/49), MGMT 和 MMP-7 的表达与星形细胞瘤组织病理分级有关($P<0.05$), 与其他临床因素无关($P>0.05$); MGMT 和 MMP-7 蛋白在星形细胞瘤中的表达率复发组与无复发组有明显差异($P<0.05$), MMP-7 抗原与 MGMT 表达呈负相关($r_s=-0.488, P<0.01$)。**结论:**MGMT 和 MMP-7 可能共同参与了星形细胞瘤的发生与发展, MGMT 的低表达甚至缺失和 MMP-7 高表达对星形细胞瘤的恶性程度及预后具有指导意义。

【关键词】星形细胞瘤; 甲基鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶; 基质金属蛋白酶-7; 免疫组织化学

【中图分类号】R739.4

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-12-11

Expression and the clinical significance of MGMT and MMP-7 in human astrocytoma

Su Geng¹, Zhou Zhiyu², Li Guocheng³, Mo Qiurong¹, Wen Wei¹

(1. Department of Pathology, Minzu Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region;

2. Department of Neurosurgery, Minzu Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region;

3. Department of Neurosurgery, Guangxi Brain Hospital)

【Abstract】Objective: To investigate the expression and significance of methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) and matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) protein in human astrocytoma. **Methods:** Protein expression of MGMT and MMP-7 was detected in 49 cases of human astrocytoma with SP immunohistochemical method. **Results:** Expression rate of MGMT was 55.10% (27/49) and those of MMP-7 was 51.02% (25/49). Expression of MGMT and MMP-7 protein was related with histological grade ($P<0.05$), but not related with other clinical factors ($P>0.05$). There was significant differences in the MGMT and MMP-7 expression rate between group with recurrence and group without recurrence ($P<0.05$). There were significant negative correlations between MGMT and MMP-7 protein expression ($r_s=-0.488, P<0.01$). **Conclusions:** MGMT and MMP-7 play important roles in occurrence and development of human astrocytoma. Low expression of MGMT and over expression of MMP-7 provide important implications of malignancy and prognosis for human astrocytoma.

【Key words】 astrocytoma; methylguanine-DNA methyltransferase; matrix metalloproteinase-7; immunohistochemistry

脑星形细胞瘤是颅内最常见的原发性肿瘤, 约占颅内肿瘤的 40%~43%^[1], 年发病率为 5/10 万左右^[2]; 尽管其治疗方法已经由单一的手术治疗发展到今天的手术加放疗和化疗等综合疗法, 但患者的预后并没有明显的改善。近来有研究资料表明, 启动子区域的异常甲基化导致的各种抑癌基因失活, 与星形细胞瘤的发生及生物学特性密切相关^[3], 而甲基

鸟嘌呤 DNA 甲基转移酶(methylguanine-DNA methyltransferase, MGMT)对这种异常甲基化, 特别是 G:C~A:T 的基因突变有保护作用。基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)在肿瘤的侵袭转移、血管生成和肿瘤发生过程中起重要作用, 基质金属蛋白酶-7(matrix metalloproteinase-7, MMP-7)具有强大的基质降解活性和广泛的底物特异性, 其区别于其他 MMP 家族成员的另一特点是在基质细胞中不表达, 而仅表达于肿瘤细胞内和肿瘤细胞

作者介绍: 苏 康, Email: SUGENGL@163.com,

研究方向: 肿瘤病理。

邻近的血管内皮细胞中^[4]。MGMT 与星形细胞瘤发生密切相关,而 MMP-7 与星形细胞瘤发展侵袭相关,因此本研究借助免疫组化技术观察脑星形细胞瘤中 MGMT 和 MMP-7 的表达及两者之间的关系,探讨两者在人脑星形细胞瘤发生及发展方面的生物学机制,为临床星形细胞瘤有效的治疗方法和治疗效果的改善提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 临床资料

取我院和广西脑科医院自 2000 年 1 月至 2009 年 5 月经手术切除,病理确诊、临床资料较完整的 49 例星形细胞瘤进行免疫组化研究,病程为 1 月至 2 年不等,术前均未经放、化疗,无糖尿病及甲亢等疾病。患者年龄为 12~63 岁,中位年龄为 41 岁,其中男性 28 例,女性 21 例;根据 2007 年 WHO 中枢神经系统肿瘤新分类分级标准,49 例胶质瘤,标本中 I 级 20 例、II 级 12 例、III 级 9 例、IV 级 8 例(表 1)。全部病例跟踪随访,并以 3 年内是否复发作为反映预后的指标。标本经 10% 福尔马林液固定,常规石蜡包埋,3 μm 连续切片。

表 1 入组 49 例病例肿瘤分级分类表 (n)

Tab.1 Tumor ranking of 49 cases of astrocytoma (n)

WHO 肿瘤级别	病例数 (n)	MGMT 阳性数	MMP-7 阳 性数
毛细胞星形细胞瘤 I 级	17	10	4
室管膜下巨细胞星形细胞瘤 I 级	3	2	3
毛粘液型星形细胞瘤 II 级	2	1	2
多形性黄瘤细胞瘤 II 级	0	0	0
弥漫性星形细胞瘤 II 级	10	9	3
间变型星形细胞瘤 III 级	9	2	7
大脑胶质瘤病 III 级	0	0	0
胶质母细胞瘤 IV 级	8	3	6
合计	49	27	25

表 2 星形细胞瘤患者临床病理特征与 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达的关系

Tab.2 Expression of MGMT and MMP-7 in human astrocytoma and its relationship with clinicopathological factors

临床病理特征	例数 (N)	MGMT 表达情况		χ^2 值 P 值	MMP-7 表达情况		χ^2 值 P 值
		阳性 (n)	阳性率 (%)		阳性 (n)	阳性率 (%)	
性别							
男	28	15	53.57	$\chi^2=0.062$	13	46.43	$\chi^2=0.551$
女	21	12	57.14	$P=0.804$	12	57.14	$P=0.458$
年龄							
≤ 40 岁	25	13	52.00	$\chi^2=0.199$	12	48.00	$\chi^2=0.186$
> 40 岁	24	14	58.33	$P=0.656$	13	54.17	$P=0.666$
病理分级							
I~II 级	32	22	68.75	$\chi^2=6.944$	12	37.50	$\chi^2=6.747$
III~IV 级	17	5	29.41	$P=0.008$	13	76.47	$P=0.009$

1.2 免疫组化染色

MGMT 和 MMP-7 单克隆即用型抗体和 SP Kits 均购自福州迈新生物技术公司产品,按 SP 法操作,DAB 显色。以已知 MGMT 和 MMP-7 阳性组织切片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.3 结果判定

MGMT 结果判定:阳性细胞表现为细胞核或浆内出现棕黄色颗粒,MMP-7 的阳性表达为细胞质内出现棕黄色细小颗粒,瘤细胞无棕色颗粒者为阴性(-)。按阳性细胞的多少来判断其阳性程度,随机观察 5 个高倍镜视野(10×40 倍),计算 1 000 个瘤组织中阳性染色细胞所占的比例,据 Beasley 免疫染色评分方法,按阳性细胞所占百分比并参考着色强度判断分级:无明显着色阳性细胞为(-),阳性细胞数 $<25\%$ 为(+), $25\% \sim 50\%$ 为(++), $>50\%$ 为(+++)。

1.4 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对所得数据进行统计分析,组间数据用卡方检验,相关分析用 Spearman 等级相关分析,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

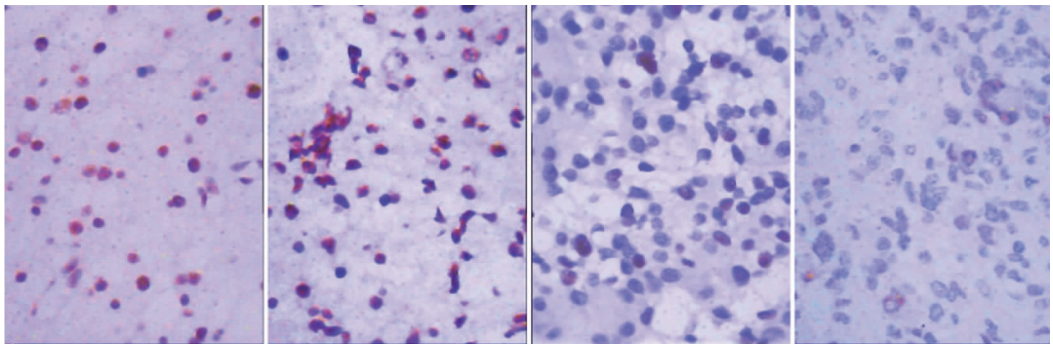
2 结果

2.1 星形细胞瘤患者临床病理特征与 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达的关系

49 例星形细胞瘤中 MGMT 阳性表达者 27 例(55.10%) (图 1),MMP-7 阳性表达者 25 例(51.02%) (图 2);MGMT 和 MMP-7 蛋白表达均与星形细胞瘤的分化程度相关($P<0.05$),MGMT 阳性表达率随着肿瘤分级(恶性程度)升高阳性表达率下降,MMP-7 阳性表达率随着肿瘤分级(恶性程度)升高阳性表达率升高;MGMT 和 MMP-7 蛋白表达均与患者性别和年龄不相关($P>0.05$),见表 2。

2.2 星形细胞瘤中 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达的相关性

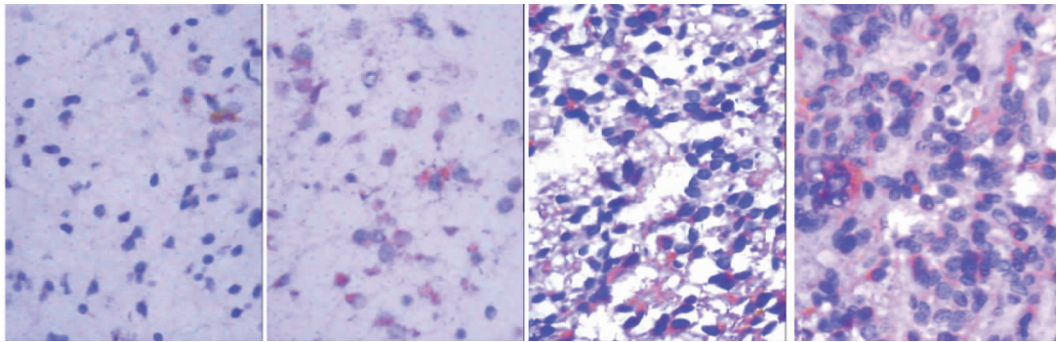
应用 Spearman 等级相关分析 MGMT 和 MMP-7 蛋白表达的相关性,结果显示相关系数 $r_s=-0.488$, $P=0.000$ 。提示 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达呈负相关($P<0.01$,差异有统计学意义),见表 3。



由左至右分别是 MGMT 在星形细胞瘤 I、II、III、IV 级各个级别的表达情况 (细胞核阳性), 其表达率依次降低

图 1 MGMT 在 I-IV 型星形细胞瘤中表达 (SP 法, 400 ×)

Fig.1 Expression of MGMT in I-IV astrocytoma (SP, 400 ×)



由左至右分别是 MMP-7 在星形细胞瘤 I、II、III、IV 级各个级别的表达情况 (细胞质阳性), 其表达率依次增强

图 2 MMP-7 在 I-IV 型星形细胞瘤中表达 (SP 法, 400 ×)

Fig.2 Expression of MMP-7 in I-IV astrocytoma (SP, 400 ×)

表 3 星形细胞瘤中 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达的相关性

Tab.3 Correlation between MGMT and MMP-7 expression in human astrocytoma

MMP-7 蛋白的 表达情况	MGMT 蛋白的表达情况				合计
	-	+	++	+++	
-	6	5	10	3	24
+	3	2	2	1	8
++	10	2	1	0	13
+++	3	1	0	0	4
合计	22	10	13	4	49

注: Spearman 等级相关分析 $r_s = -0.488, P = 0.000$

2.3 星形细胞瘤患者 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达与肿瘤复发关系

49 例星形细胞瘤患者随访调查发现, 其中 3 年内复发者 31 例, 无复发者 18 例。MMP-7 蛋白阳性表达组复发率为

64.52%, 明显高于阴性表达组 27.78% ($\chi^2 = 6.151, P = 0.013$), MGMT 蛋白阳性表达组复发率为 41.94%, 明显低于阴性表达组 77.78% ($\chi^2 = 5.913, P = 0.015$), 见表 4。

3 讨论

星形细胞瘤是恶性程度极高、预后不佳的肿瘤之一, 严重影响人类健康。尽管目前有手术、放疗、化疗或综合治疗措施, 但仍不能根治恶性星形细胞瘤, 因此, 阐明星形细胞瘤发生和发展侵袭的分子病理机制, 进而寻求其他有效治疗途径已成为神经外科的前沿课题之一。用免疫组化方法研究星形细胞瘤中 MGMT 和 MMP-7 的表达及两者之间的关系, 探讨两者在星形细胞瘤发生及发展方面的生物

表 4 星形细胞瘤患者 MGMT 蛋白和 MMP-7 蛋白表达与肿瘤复发关系

Tab.4 Relationship between tumor recurrence and MGMT and MMP-7 expression in human astrocytoma

复发与否	例数 (n)	MGMT 表达情况		χ^2 值 P 值	MMP-7 表达情况		χ^2 值 P 值
		阳性 (n)	阳性率 (%)		阳性 (n)	阳性率 (%)	
有复发	31	13	41.94	$\chi^2 = 5.913$	20	64.52	$\chi^2 = 6.151$
无复发	18	14	77.78	$P = 0.015$	5	27.78	$P = 0.013$

学机制,为临床治疗提供理论基础。

MGMT 是一种能够修复 DNA 烷化剂损伤的 DNA 修复酶。基因启动子异常甲基化和肿瘤的发生关系密切,而基因启动子非甲基化正常状态的维持则是靠甲基化转移酶的作用来实现,它同时发挥转移酶与甲基接受体的作用,在 DNA 交联形成前将烷化基团从 O6-mG 的 O6 位转移到自身半胱氨酸残基上,使 DNA 链上的鸟嘌呤损伤修复,同时 MGMT 在转甲基后不可逆地失去活性。MGMT 是体内唯一一种可以去除这种甲基化损伤的 DNA 修复酶^[9],它可以将 O6 鸟嘌呤化合物从 DNA 上移除,阻止肿瘤的发生。MGMT 不仅在保护细胞免受烷基类物质的毒性、突变性和致癌活性中具有决定性作用,同时也维持了其他抑癌基因的功能。如果在 DNA 复制前 O6-甲基鸟嘌呤不被修复,将导致 G:C→A:T 突变,这些突变若发生在原癌基因或抑癌基因,则可能导致癌变^[6]。MGMT 蛋白表达的缺失或突变与许多恶性肿瘤有关,包括胰腺癌^[7]、结肠癌^[8]、星形细胞瘤^[9]等。本实验也表明 MGMT 蛋白在人脑星形细胞瘤中的表达与性别、年龄无关,与 Esteller 等的研究^[10]一致,而与肿瘤分级相关,从低级别组到高级别组表达水平依次降低,分别为 68.75%、29.41%,MGMT 蛋白的表达率随着星形细胞瘤恶性程度升高而降低;MGMT 蛋白阳性表达组复发率为 41.94%,明显低于阴性表达组(77.78%),说明 MGMT 蛋白在星形细胞瘤中发挥着抑癌基因的功能。Sun 等^[11]对星形细胞瘤患者预后和 MGMT 蛋白表达之间关系的研究表明,MGMT 蛋白表达阴性的患者生存期要明显长于 MGMT 阳性者,这与本研究结果类似。因此认为 MGMT 的缺失可作为早期星形细胞瘤发生的预兆。

细胞外基质在维持正常组织结构与功能中发挥重要作用,其组成成分较多,与肿瘤细胞侵袭等特征密切相关。Liotta 等的研究^[12]发现胶质瘤的侵袭性可能与肿瘤细胞和血管内皮细胞相互作用有关。近年来不少研究发现,脑星形细胞瘤细胞可分泌多种基质金属蛋白酶,在星形细胞瘤标本中也发现有基质金属蛋白酶含量升高^[13]。MMP-7 又称基质溶解素,是 MMPs 中一个非常重要的成员,由于缺乏与血红素结构蛋白同源序列而成为家族最小成员^[14],具有广泛的作用底物,可降解包括弹力纤维、纤维连接素、蛋白多糖、IV 型胶原纤维等在内的多种细胞外基质,破坏肿瘤侵入的自然屏障(细胞外基质),它还可以灭活 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶来激活其它 MMPs^[13],

并增强降解细胞外基质及基底膜的能力。在本研究中,发现星形细胞瘤 MMP-7 的表达与肿瘤的 WHO 分级呈正相关,即高级别星形细胞瘤中 MMP-7 表达阳性率比低级别星形细胞瘤明显增加,另外 MMP-7 阳性表达率高的星形细胞瘤患者与阳性率低者相比,术后肿瘤复发率较高,说明 MMP-7 在星形细胞瘤的发展、浸润和转移过程中发挥了重要作用。国内外学者^[15-16]提出其侵袭机制可能是 MMP-7 过量表达降解了肿瘤细胞周围基质和脉管基底膜,导致其屏障功能的破坏,使肿瘤细胞易于侵入周围组织和脉管系统,从而实现肿瘤的浸润及转移。

另外本研究发现星形细胞瘤中 MGMT 与 MMP-7 的表达呈负相关。MGMT 与 MMP-7 在星形细胞瘤的共同作用机制,国内外尚未见相关文献,推测可能是由于受烷基类物质的毒性、突变性和致癌活性因素作用下,MGMT 的缺失导致其失去了抑癌基因的功能,基因的损伤得不到及时的修复,导致细胞间黏附能力随之下降,而 MMP-7 的高表达使肿瘤细胞向基质侵袭,增加了 MMP-7 的降解能力而使神经胶质细胞向进展期转变,MGMT 基因的失活或突变促进了星形细胞瘤细胞的进展,而神经胶质细胞分泌的 MMP-7 能降解细胞外基质,进一步促进星形细胞瘤的侵袭性生长,形成了连锁反应进而共同促进肿瘤生长与侵袭,至于其更高层次的分子机制,有待于进一步深入研究。

综上所述,MGMT 蛋白低表达而 MMP-7 蛋白高表达者,肿瘤分化差,增殖侵袭能力强,恶性程度高,术后转移、复发机率大,联合检测 MGMT 及 MMP-7 抗原有助于筛选高危患者,至于能否根据 MMP-7 和 MGMT 蛋白的异常表达为星形细胞瘤患者提供确实有效、个体化的治疗方案还有待于进一步的临床实践研究。

参 考 文 献

- [1] Edwards LA, Woolard K, Son MJ, et al. Effect of brain- and tumor-derived connective tissue growth factor on glioma invasion[J]. J Natl Cancer Inst, 2011, 103(15): 1162-1178.
- [2] Stupp R, Hegi ME, van den Bent MJ, et al. Changing paradigms; an update on the multidisciplinary management of malignant glioma[J]. Oncologist, 2006, 11(2): 165-180.
- [3] Komine C, Watanabe T, Katayama Y, et al. Promoter hypermethylation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase is an independent predictor of shortened progression free survival in

基础研究

DOI: 10.13406/j.cnki.cyxh.2014.01.009

湿性年龄相关性黄斑变性患者外周血单个核细胞
Toll样受体 3 的表达及意义

祝 毅, 钱 丹, 钟沐睿, 彭 惠

(重庆医科大学附属第一医院眼科、重庆市眼科学重点实验室, 重庆 410006)

【摘要】目的:探索 Toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)3/4 在湿性年龄相关性黄斑变性(age-related macular degeneration, AMD)患者外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)的表达及其意义。**方法:**25 例湿性 AMD 患者和 24 例正常对照纳入本研究。患者与正常对照组均不患有糖尿病、冠心病、高血压等慢性疾病或免疫性疾病及与免疫相关的疾病。采用 real-time PCR 的方法检测 TLR3/4 的基因水平的表达,流式细胞术检测 TLR3 蛋白水平的表达。TLR3 特定的配体 PolyI:C 刺激后,ELISA 检测白介素(interleukin, IL)-6、IL-8、单核细胞趋化蛋白 1(monocyte chemotactic protein 1, MCP-1)的表达。**结果:**在 PBMCs 水平,AMD 组 TLR3 在 mRNA 及蛋白水平表达均显著高于正常对照组,而 TLR4 的 mRNA 水平表达在 2 组之间无统计学差异。与对照组 PBMCs 相比,AMD 组 PBMCs IL-6 及 IL-8 的表达明显升高,TLR3 的配体 PolyI:C 刺激后,AMD 组 PBMCs IL-6 的表达显著增多,MCP-1、IL-8 的表达在 2 组之间无统计学差异。**结论:**TLR3 在 AMD 组表达上调,活化后可促进 IL-6 表达增多。由此推测 TLR3 信号通路可能通过促进促炎性细胞因子的表达在湿性 AMD 的发病发展中发挥着重要作用。

【关键词】年龄相关性黄斑变性;Toll 样受体;外周血单个核细胞;细胞因子;视网膜

【中图分类号】R774.5

【文献标志码】A

【收稿日期】2013-03-05

作者介绍:祝 毅,Email:389151094@qq.com,

研究方向:眼外伤、玻璃体视网膜疾病、眼底病。

通信作者:彭 惠,Email:pengh9@sina.com。

基金项目:重庆市卫生局重点资助项目(编号:2012-1-026)。

patients with low-grade diffuse astrocytomas[J].Brain Pathol, 2003, 13(2):176-184.

[4] 饶雪峰,刘伟中,廖传文,等.MMP-7 在肝细胞癌组织中的表达及临床意义[J].世界华人消化杂志,2009,17(28):2903-2907.

[5] Fox JG, Wang TC. Inflammation, atrophy, and gastric cancer[J]. J Clin Invest, 2007, 117(1):60-69.

[6] Vielhauer V, Sarafoff M, Gais P, et al. Cell type-specific induction of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase mRNA expression in rat liver during regeneration, inflammation and preneoplasia[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2001, 127(10):591-602.

[7] Ishikawa T, Zhang SS, Qin X, et al. DNA repair and cancer: lessons from mutant mouse models[J]. Cancer Sci, 2004, 95(2):112-117.

[8] Noda H, Mashima R, Kamiyama H, et al. Promoter hypermethylation of tumor-related genes in sporadic colorectal cancer in young patients[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2007, 26(4):521-526.

[9] Weaver KD, Grossman SA, Herman JG. Methylated tumor-specific DNA as a plasma biomarker in patients with glioma [J]. Cancer Invest, 2006, 24(1):35-40.

[10] Esteller M, Garcia-Foncillas J, Andion E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents[J]. N Engl J Med, 2000, 343(19):1350-1354.

[11] Sun YH, Zhang YZ, Wang ZC, et al. Relationship between the expression of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioma and the survival time of patients[J]. Ai Zheng, 2004, 23(9):1052-1055.

[12] Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface[J]. Nature, 2001, 411(6835):375-379.

[13] Samukange V, Yasukawa K, Inouye K, et al. Interaction of 8-anilino-naphthalene 1-sulphonate(ANS) and human matrix metalloproteinase 7(MMP-7) as examined by MMP-7 activity and ANS fluorescence[J]. J Biochem, 2012, 151(5):533-540.

[14] Kivisaari AK, Kallajoki M, Mirtti T, et al. Transformation-specific matrix metalloproteinases(MMP)-7 and MMP-13 are expressed by tumour cells in epidermolysis bullosa-associated squamous cell carcinomas[J]. Br J Dermatol, 2008, 158(4):778-785.

[15] Varro A, Kenny S, Hemers E, et al. Increased gastric expression of MMP-7 in hypergastrinemia and significance for epithelial-mesenchymal signaling[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2007, 292(4):G1133-1140.

[16] 冯俊伟,张志勇,刘爱东,等.结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达相关性研究[J].重庆医科大学学报,2012,37(3):205-208.

(责任编辑:冉明会)