

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2012.03.005

结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达相关性研究

冯俊伟¹, 张志勇², 刘爱东³, 吴晨鹏², 胡月明²

(唐山市工人医院 1. 肿瘤外科; 2. 病理科; 3. 唐山职业技术学院病理科, 唐山 063000)

【摘要】目的: 通过检测结直肠癌中基质金属蛋白酶-7(Matrix metalloproteinase-7, MMP-7)、血管内皮生长因子-D(Vascular endothelial growth factor-D, VEGF-D)和血管内皮生长因子受体-3(Vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)的表达, 探讨 MMP-7 与淋巴管生成因子的关系。方法: 应用免疫组化法检测 124 例结直肠癌和 70 例正常黏膜组织中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达, 比较两种组织中 3 种蛋白表达的差异, 分析其与结直肠癌临床病理指标的关系及三者的相关性。结果: MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 表达的阳性率在结直肠癌中明显高于黏膜组织($P<0.001$), MMP-7 的表达与结直肠癌的肿瘤体积、Dukes 分期、浸润深度及淋巴结转移有关($P<0.05$); VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达与肿瘤体积、淋巴结转移有关($P<0.05$)。结直肠癌中 MMP-7 和 VEGF-D、VEGFR-3 的表达呈正相关性(均 $P=0.01$)。MMP-7 和 VEGF-D、VEGFR-3 的高表达与患者的不良预后相关($P<0.05$)。结论: 结直肠癌中 MMP-7 的表达与 VEGF-D、VEGFR-3 的表达密切相关, 可能在淋巴管新生中起协同作用, 促进淋巴道转移。联合检测 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 可能对判断结直肠癌的预后有一定的指导意义。

【关键词】结直肠癌; MMP-7; VEGF-D; VEGFR-3; 预后

【中国图书分类法分类号】R735.3

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-09

Expressions of MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 in colorectal carcinoma and its clinic significance

FENG Junwei¹, ZHANG Zhiyong², LIU Aidong³, WU Chenpeng², HU Yue ming²

(1. Department of Oncological Surgery; 2. Department of Pathology, Tangshan Gongren Hospital;

3. Department of Pathology, Tangshan Vocational and Technology College)

【Abstract】Objective: To study the expressions of matrix metalloproteinase-7(MMP-7), vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D) and (Vascular endothelial growth factor receptor-3)(VEGFR-3) in colorectal carcinomas and relationship between MMP-7 expression and lymphangiogenesis. Methods: 124 primary tumors with colorectal carcinoma were studied, together with 70 normal colorectal tissues by immunohistochemistry. Results: The expressions of MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 were higher in the primary tumors than those in mucosa. MMP-7 expression was associated with tumor volume, Dukes stage, invasive depth and lymph node metastasis. VEGF-D and VEGFR-3 expressions were associated with tumor volume and lymph node metastasis. There was positive correlation between MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 in primary tumors. The higher expressions of MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 indicated worse prognosis in colorectal carcinoma. Conclusion: MMP-7 overexpression was closely related to the expressions of VEGF-D and VEGFR-3 that might be involved in the lymphangiogenesis. MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 might be helpful to predict the prognosis of colorectal carcinoma.

【Key words】colorectal carcinoma; Matrix metalloproteinase-7 (MMP-7); Vascular endothelial growth factor-D (VEGF-D); Vascular endothelial growth factor receptor-3(VEGFR-3); prognosis

血管内皮生长因子-D(Vascular endothelial growth factor-D, VEGF-D)与血管内皮生长因子受体-3(Vascular endothelial growth factor receptor-3, VEGFR-3)结合促进肿瘤的淋巴

管新生^[1,2]。基质金属蛋白酶-7(Matrix metalloproteinase-7, MMP-7)是基质金属蛋白酶家族(MMPs)中重要的锌依赖蛋白酶之一。肿瘤通过分泌MMP-7来降解构成基底膜的成分, 促使肿瘤浸润和转移^[3]。近年有报道 MMP-7 与肿瘤脉管生成可能有关^[4]。本研究应用免疫组化法检测结直肠癌中MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达, 分析其与不同临床病理指标的关系, 探讨 MMP-7与结直肠癌中淋巴管生成因子的关系及对预后的意义。

作者介绍: 冯俊伟(1972-), 男, 副主任医师, 硕士,

研究方向: 胃肠道肿瘤的临床治疗与基础研究。

通信作者: 张志勇, 女, 教授, Email: zhiyongzhang1@hotmail.com。

基金项目: 河北省科学技术研究与发展计划资助项目(编号: 07276101D

-50)。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2000 年 1 月至 2003 年 12 月在唐山市工人医院行结直肠癌根治术的存档蜡块。病例纳入标准:①符合 WHO 分类中消化系统肿瘤病理学和遗传学的诊断标准。②术前均未进行任何放、化疗;③临床随访资料完整。根据以往多年来我们一直进行大肠癌的研究,标本量基本在 100 余例左右。此次研究共 124 例,其中男性 69 例,女性 55 例,年龄为 31~69 岁,平均 (55.4 ± 8.4) 岁。无淋巴结转移者 57 例,有淋巴结转移者 67 例。同时选择切缘结肠黏膜组织 70 例作为对照,且经病理常规 HE 染色确定为无瘤黏膜。以上病例均于术后经过正规治疗。所有病例信息及临床病理特征均采自本院病案存档的临床病例及病理诊断报告系统。

1.2 免疫组化检测

一抗鼠抗 VEGF-D 抗体购自美国 R&D 公司,稀释度为 1:50。兔抗 VEGFR-3 抗体购自美国 Lab Vision 公司,稀释度 1:50。兔抗 MMP-7、二抗和显色剂均购自北京中杉金桥生物制品有限公司。操作严格按照说明书进行。同时设有阴性对照(见图 1)和阳性对照。

1.3 结果判定

MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 蛋白阳性染色均定位于细胞质之中,呈棕黄色为阳性细胞,随机观察计数 10 个高倍视野的阳性表达细胞数,平均每高倍镜视野的阳性细胞数 $\geq 10\%$ 为阳性(+), $<10\%$ 为阴性(-)。

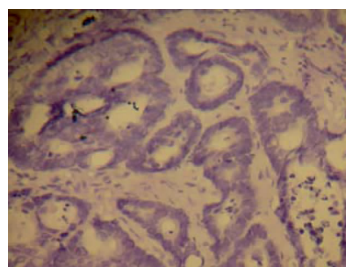


图 1 结直肠癌组织的阴性对照片 (IHC $\times 200$)

Fig.1 Negative control in colorectal carcinoma (IHC $\times 200$)

1.4 统计学处理

应用 SAS 6.12 统计软件进行数据处理,2 组间比较采用 χ^2 检验,并进行 Spearman 线性相关分析,同时对患者进行 Log-rank 生存分析,以双侧 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 在结直肠癌和正常黏膜组织的表达

在结直肠癌组织中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达阳性率明显高于正常黏膜组织($P < 0.001$,见表 1,图 2~4)。

2.2 结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达与临床病理特征的关系

结直肠癌中 MMP-7 的表达与肿瘤体积、Dukes 分期、淋巴结转移及浸润深度密切相关(均 $P < 0.05$),VEGF-D 和 VEG-

表 1 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 在结直肠癌和正常结肠黏膜组织的表达

Tab.1 Expressions of MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 in colorectal carcinoma and normal colorectal tissues

组别	例	MMP-7		P	VEGF-D		P	VEGFR-3		P
		+(%)	-(%)		+(%)	-(%)		+(%)	-(%)	
结直肠癌组	124	74 (59.7%)	50 (40.3%)	<0.000 1	87 (70.2%)	37 (29.8%)	<0.000 1	80 (64.5%)	44 (35.5%)	0.000 5
黏膜组	70	21 (30.0%)	49 (70.0%)		19 (27.1%)	51 (72.9%)		27 (38.8%)	43 (61.2%)	

表 2 结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达与临床病理特征的关系

Tab.2 Relationship between expressions of MMP-7, VEGF-D and VEGFR-3 and clinicopathological characteristics

in colorectal carcinoma										
变量	例	MMP-7		P	VEGF-D		P	VEGFR-3		P
		+(%)	-(%)		+(%)	-(%)		+(%)	-(%)	
肿瘤体积				0.009			<0.000 1			0.013
≤2 cm	52	24 (46.2%)	28 (53.8%)		24 (46.2%)	28 (53.8%)		27 (51.9%)	25 (48.1%)	
>2 cm	72	50 (69.4%)	22 (30.6%)		63 (87.5%)	9 (12.5%)		53 (73.6%)	19 (26.4%)	
浸润深度				0.010						0.003
未及浆膜	62	30 (48.4%)	32 (51.6%)		38 (61.3%)	24 (38.7%)		32 (51.6%)	30 (48.4%)	
浆膜及以外	62	44 (70.9%)	18 (29.0%)		49 (79.0%)	13 (21.0%)		48 (77.4%)	14 (22.6%)	
淋巴结转移				0.110						0.044
无	61	32 (36.1%)	29 (63.9%)		37 (60.7%)	24 (40.3%)		21 (34.4%)	40 (65.6%)	
有	63	42 (82.5%)	21 (17.5%)		50 (79.4%)	13 (20.6%)		33 (52.4%)	30 (47.6%)	
Dukes 分期				0.008						0.392
A+B	64	31 (48.4%)	33 (51.6%)		43 (67.2%)	21 (32.8%)		25 (39.1%)	39 (60.9%)	
C+D	60	43 (71.7%)	17 (28.3%)		44 (73.3%)	16 (26.7%)		28 (46.7%)	32 (53.3%)	

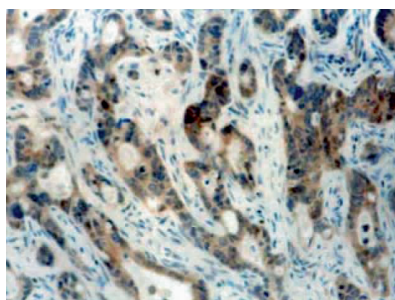


图 2 MMP-7 在结直肠癌组织中的表达
(IHC, 200 ×)

Fig.2 Expressions of MMP-7 in colorectal carcinoma (IHC, 200 ×)

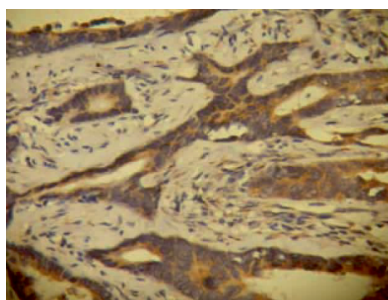


图 3 VEGF-D 在结直肠癌组织中的表达
(IHC, 200 ×)

Fig.3 Expressions of VEGF-D in colorectal carcinoma (IHC, 200 ×)

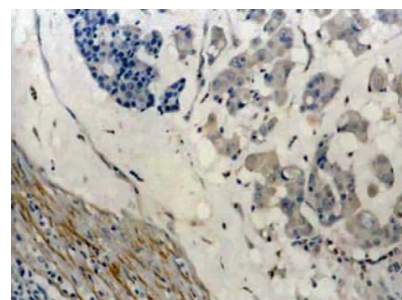


图 4 VEGFR-3 在结直肠癌组织中的表达
(IHC, 200 ×)

Fig.4 Expressions of VEGFR-3 in colorectal carcinoma (IHC, 200 ×)

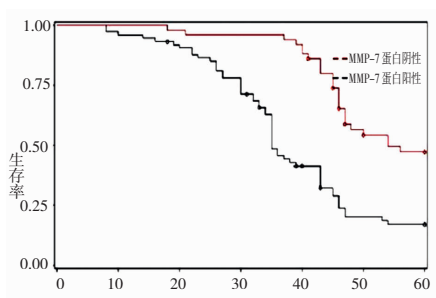


图 5 MMP-7 在结直肠癌组织中的表达与预后的关系

Fig.5 Relationship between expression of MMP-7 and prognosis in colorectal carcinoma

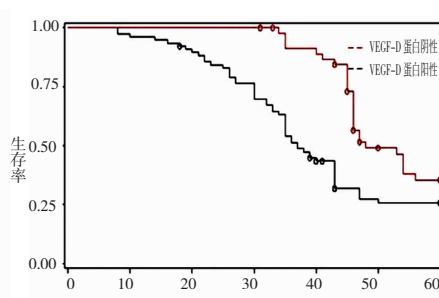


图 6 VEGF-D 在结直肠癌组织中的表达与预后的关系

Fig.6 Relationship between expression of VEGF-D and prognosis in colorectal carcinoma

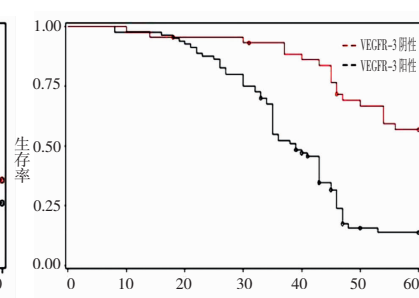


图 7 VEGFR-3 在结直肠癌组织中的表达与预后的关系

Fig.7 Relationship between expression of VEGFR-3 and prognosis in colorectal carcinoma

FR-3 的表达与肿瘤体积、淋巴结转移有关,与 Dukes 分期、浸润深度无关。而且三者的表达与性别、年龄、部位、肿瘤部位、组织学分型、分化分级、炎细胞浸润和淋巴结转移个数无关($P>0.05$,见表 2)。

2.3 结直肠癌中 MMP-7 和 VEGF-D、VEGFR-3 的表达相关性

结直肠癌中 MMP-7 和 VEGF-D($r=0.41, P=0.01$)、MMP-7 和 VEGFR-3 ($r=0.43, P=0.01$) 的表达均呈正相关。

2.4 结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达与预后的关系

随访时间为 8~60 个月,平均 36.2 个月。如图 5~7 所示,结直肠癌中 MMP-7 和 VEGF-D、VEGFR-3 的表达与预后相关($P<0.05$),即 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 高表达的患者预后差。

3 讨论

恶性肿瘤的生物学行为影响着肿瘤的生长及转移,也影响着患者的预后。肿瘤转移时,细胞外基质发生降解,为肿瘤突破基底膜创造了必要的环境。MMPs 是一组重要的锌依赖

蛋白酶,MMP-9 可能具有促进乳腺癌淋巴道转移的作用^[9]。MMP-7 是 MMPs 中的重要成员,又称为基质溶解素,是分子量为 28 kD 的蛋白,蛋白分子以酶原形式分泌到基质中,多种原癌基因、生长因子及细胞因子均可促进 MMP-7 的分泌及表达^[6]。MMP-7 具有广泛的底物特异性和强大的基质降解功能,肿瘤细胞通过分泌 MMP-7 来降解构成基底膜的成分,从而破坏了机体防御时肿瘤浸润与转移的自然屏障,促使肿瘤浸润和转移^[7]。MMP-7 主要表达于肿瘤细胞和肿瘤浸润边缘的间质,在其发展过程中可以诱导肿瘤的血管和淋巴管新生。因此其在降解细胞外基质的过程中,对诱导淋巴管新生及淋巴道转移有明显的促进作用,是肿瘤转移过程中最强的促进因子。但是无论原发性肿瘤还是继发肿瘤在淋巴道扩张及转移中均依赖淋巴管内皮细胞的增殖、管道化、形成分支,进而形成淋巴管环。而肿瘤中有淋巴管生成的作用,目前多集中于 VEGF-C、VEGF-D 及其受体的表达上^[8,9]。VEGF-D 被认为是淋巴管生成因子,VEGFR-3 被认为是淋巴管生长因子的受体。前期研究表明,VEGF-D/VEGFR-3 与淋巴管生成相关,并且与结直肠癌的发生发展及预后有关^[8,10]。该信号传导途径诱导肿瘤淋巴管生成的功能为人们了解淋巴系统的功能和开展新的抗淋巴管生成治疗提供了新的机会^[11]。近来

有研究显示 MMP-7 与 VEGF 在结直肠癌中的相关作用可能与肿瘤复发有关^[12,13],由于 VEGF-D 与 VEGF 具有同源性,且结构上具有较多相似性,因此 MMP-7 与 VEGF-D 在结直肠癌的发生发展中是否具有相关性是本研究探讨的一个焦点。

本研究结果提示结直肠癌中 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 高表达,提示三者 在结直肠癌的发生过程中起重要的促进作用。而且 MMP-7 的表达与肿瘤体积、Dukes 分期、淋巴结转移及浸润深度密切相关,VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达与肿瘤体积、淋巴结转移有关。肿瘤体积大、浸润深、Dukes 分期晚、淋巴结转移均与肿瘤的高侵袭性生物学行为有关,提示 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的表达在肿瘤的发展中也起一定的促进作用,三者均与癌细胞的淋巴道转移有关。加之 MMP-7 的表达和 VEGF-D、VEGFR-3 的表达呈正相关性,提示结直肠癌中 MMP-7 可能与促进淋巴管生成的淋巴管生成因子及其受体相互作用,在淋巴管新生的过程起协同/促进作用,金属基质蛋白酶与淋巴管生成、淋巴道转移可能存在着某种通路。VEGF-D 和 VEGFR-3 的通路作用已成为淋巴管生成的经典途径,二者结合后使 RAFTK 酪氨酸激酶活化,还可以激活 Ras/MAPK 信号通路或 JNK 通路,诱导淋巴管内皮细胞肌动蛋白重组,刺激其增殖,是淋巴管内皮增生、迁移,进而促进肿瘤的淋巴管生成,而 MMP-7 高表达时可能诱导 VEGF-D 和 VEGFR-3 高表达,使癌细胞在降解细胞外基质的同时促进淋巴管增殖,有利于结直肠癌细胞淋巴道转移。MMP-7 促进癌细胞发生转移及促进淋巴管形成时,也可能与其抑制剂相对不足有关,进而引起肿瘤细胞不断浸润,并经淋巴管向周围播散,引起局部淋巴道转移。由于本研究仅为一个中心的抽样研究,MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 与某些侵袭性指标没有统计学关系,可能需要进一步扩大样本量或者多中心联合抽样研究。通过生存分析显示,本研究中 MMP-7 和 VEGF-D、VEGFR-3 高表达患者的生存期短,提示对术后结直肠癌组织进行 MMP-7、VEGF-D 和 VEGFR-3 的联合检测,对预后的判断及指导治疗可能有临床价值。

总之,结直肠癌中 MMP-7 的高表达与 VEGF-D 和 VEGFR-3 的高表达密切正相关,三者可能在结直肠癌的发生发展中起协同作用,促进淋巴道转移,术后联合检测该 3 种蛋白可能成为判断结直肠癌患者的预后的参考指标。

参 考 文 献

- [1] Ko Y H, Jung C K, Lee M A, et al. Clinical significance of vascular endothelial growth factors (VEGF)-C and -D in resected non-small cell lung cancer[J]. Cancer Res Treat, 2008, 40(3): 133-140.
- [2] Goodyear S M, Kheyfets S B, Garcia F U, et al. Role of the VEGFR3/VEGFD receptor axis in TGFbeta1 activation of primary prostate cell lines[J]. Prostate, 2009, 69(9): 982-990.
- [3] Luukkaa H, Kleini P, Hirsimäki P, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-7 in salivary gland cancer[J]. Acta Oncol, 2010, 49(1): 85-90.
- [4] Koskensalo S, Mrena J, Wiksten J P, et al. MMP-7 overexpression is an independent prognostic marker in gastric cancer[J]. Tumour Biol, 2010, 31(3): 149-155.
- [5] 韩玉贞, 张志强, 桑 晶, 等. 乳腺癌组织中 LVD、VEGF-C 和 MMP-9 表达及其相关性[J]. 临床与实验病理学杂志, 2011, 27(1): 19-21.
- [6] Han Y Z, Zhang Z Q, Sang J, et al. Expression of VEGF-C, MMP-9 and lymphatic vessel density in breast carcinoma and their correlation[J]. Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology, 2011, 27(1): 19-21.
- [7] Wu S H, Lu S, Tao H J, et al. Correlation of polymorphism of IL-8 and MMP-7 with occurrence and lymph node metastasis of early stage cervical cancer[J]. J Huazhong Univ Sci Technol (Med Sci), 2011, 31(1): 114-119.
- [8] Szarvas T, Jäger T, Becker M, et al. Validation of circulating MMP-7 level as an independent prognostic marker of poor survival in urinary bladder cancer[J]. Pathol Oncol Res, 2011, 17(2): 325-332.
- [9] 王明复, 冯俊伟, 高艳敏, 等. D2-40 阳性微淋巴管密度与直肠癌进展的关系[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(13): 1267-1269.
- [10] Wang M F, Feng J W, GAO Y M, et al. The relationship between D2-40 positive micro-lymph vessel density and progression of rectal carcinoma[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2011, 26(13): 1267-1269.
- [11] Ueda M, Hung Y C, Terai Y, et al. Vascular endothelial growth factor-C expression and invasive phenotype in ovarian carcinomas[J]. Clin Cancer Res, 2005, 11(9): 3225-3232.
- [12] 张志勇, 姜 丽, 高艳敏, 等. 大肠癌中 VEGF-D、VEGFR-3 表达及淋巴管生成关系的研究[J]. 中国老年学杂志, 2006, 26(7): 867-869.
- [13] Zhang Z Y, Jang L, GAO Y M, et al. Relationship between expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF)-D and VEGF receptor (VEGFR)-3 and lymphangiogenesis in carcinoma of large intestine[J]. Chinese Journal of Gerontology, 2006, 26(7): 867-869.
- [14] Wang L, Cai S R, Zhang C H, et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II type 1 receptor blockers on lymphangiogenesis of gastric cancer in a nude mouse model[J]. Chin Med J (Engl), 2008, 121(21): 2167-2171.
- [15] Ito T K, Ishii G, Chiba H, et al. The VEGF angiogenic switch of fibroblasts is regulated by MMP-7 from cancer cells[J]. Oncogene, 2007, 26(51): 7194-7203.
- [16] Gomes E G, Jucá M J, de Menezes H L, et al. Correlation between the immunohistochemical expressions of MMP-1, MMP-7 and VEGF and prognostic factors in colorectal adenocarcinoma[J]. Acta Cir Bras, 2009, 24(4): 303-310.

(责任编辑: 关蕴良)