

• 论 著 •

细胞外基质蛋白 1 在肿瘤中的表达及意义

侯彦强¹, 范列英¹, 屠小卿¹, 朱 烨¹, 周演武¹, 姜加陶¹, 何 玮², 倪 健², 孔宪涛¹, 仲人前^{1*}

(1. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003; 2. 上海富纯中南生物技术有限公司, 上海 201702)

[摘要] **目的:**探讨细胞外基质蛋白 1(extracellular matrix protein 1, ECM1)在肿瘤组织中的表达及意义。**方法:**应用免疫组织化学 EnVision 法, 检测肝脏、乳腺、直肠组织(正常组织和肿瘤组织)中 ECM1 的表达, 比较正常组织和肿瘤组织淋巴结转移肿瘤和淋巴结未转移肿瘤之间的 ECM1 表达差异。**结果:**ECM1 的表达如下:正常肝组织阳性率 20.0%(4/20), 肝癌组织阳性率 85.4%(70/82);正常乳腺组织阳性率 9.1%(1/11), 乳腺癌组织阳性率 60.0%(18/30), 其中淋巴结(-)者为 37.5%(6/16), 淋巴结(+)者为 85.7%(12/14);正常直肠组织阳性率 11.8%(2/17), 直肠癌组织阳性率 54.5%(18/33), 其中淋巴结(-)者为 33.3%(6/18), 淋巴结(+)者为 80.0%(12/15)。统计分析表明, 对 ECM1 的表达, 肿瘤组织高于正常组织, 淋巴结转移性肿瘤高于非转移性($P < 0.01$)。**结论:**ECM1 在肿瘤组织中过表达, 并且与肿瘤的转移相关。

[关键词] 细胞外基质蛋白 1; 肿瘤; 肿瘤转移**[中图分类号]** R 73**[文献标识码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2004)12-1314-03

Expression and significance of extracellular matrix protein 1 in tumors

HOU Yan-Qiang¹, FAN Lie-Ying¹, TU Xiao-Qing¹, ZHU Ye¹, ZHOU Yan-Wu¹, LOU Jia-Tao¹, HE Wei², NI Jian², KONG Xi-an-Tao¹, ZHONG Ren-Qian^{1*} (1. Department of Laboratory Medicine, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Shanghai Fuchun Zhongnan Biotech Company Ltd., Shanghai 201702)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the expression and significance of extracellular matrix protein 1 (ECM1) in tumor tissues. **Methods:** Immunohistochemical EnVision method was used to detect expression of ECM1 in the liver, breast and colon tissues (normal tissues and tumor tissues), and the difference of ECM1 positive rates were compared between normal tissues and tumor tissues and between with lymph node metastasis tumor tissues and without lymph node metastasis tumor tissues. **Results:** ECM1 positive rates were as follows: the positive rate of normal liver tissues was 20% (4/20), liver cell carcinoma tissues 85.4% (70/82); normal breast tissues 9.1% (1/11), breast carcinoma tissues 60% in which the positive rate of breast carcinoma tissues without lymph node metastasis was 37.5% (6/16) and breast carcinoma tissues with lymph node metastasis was 85.7% (12/14); normal colorectal tissues 11.8% (2/17), colon cancer 54.5% in which the positive rate of colon cancer without lymph node metastasis was 33.3% (6/18) and colon cancer with lymph node metastasis was 80% (12/15). These results showed that the expression of ECM1 in tumor tissues was higher than that in normal tissues ($P < 0.01$), and that the expression of ECM1 in metastatic tumors was higher than that in non-metastatic tumors ($P < 0.01$). **Conclusion:** ECM1 is over-expressed in tumor tissues, which is correlated with the metastasis properties of the tumors.

[KEY WORDS] extracellular matrix protein 1; neoplasms; neoplasm metastasis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(12):1314-1316]

细胞外基质蛋白 1(extracellular matrix protein 1, ECM1)是 1994 年 Mathieu 等^[1]在鼠的成骨基质细胞系 MN7 中分离出来的一种相对分子质量为 85 000 的分泌性糖蛋白。近年来对 ECM1 的研究发现其具有多种功能, 其中 Han 等^[2]研究发现, ECM1 可促进血管内皮细胞的增殖(在体外培养中)和血管的生成(在鸡胚中), 同时还证明了 ECM1 存在于 2 个恶性程度较高的乳腺癌细胞系 MDA-435 和 LCC15 的基质中, 而相对恶性程度较低的乳腺癌细胞系 MCF-7、SK-BR3 等则不表达 ECM1, 提示 ECM1 的表达可能与肿瘤及肿瘤的转移有关联, 因此本研究采用免疫组化检测技术, 对 ECM1 在几种

常见肿瘤中的表达情况进行检测, 来探讨 ECM1 与肿瘤的关系。

1 材料和方法

1.1 材料 肝组织芯片(正常肝脏组织和肝癌组织)购自陕西超英生物科技有限公司; 肝、乳腺和直

[基金项目] 国家自然科学基金(30080027); 上海市基础研究重大项目(02JC14005); 上海市卫生系统百人跨世纪学科带头人培养基金(沪卫科 9713)。

[作者简介] 侯彦强(1973-), 男(汉族), 博士生, 主管技师。
E-mail: houyanqiang@yahoo.com.cn

*Corresponding author. E-mail: rqzhong@guomai.sh.cn

肠标本(正常组织和癌组织)收集自瑞金医院。筛选条件:(1)所选用标本具有完整的临床资料,手术前均未经任何抗癌治疗;(2)标本经 10% 甲醛溶液常规固定,脱水,包埋,蜡块保存备用;(3)所选标本未考虑性别、年龄、职业等其他因素。EnVision 两步法免疫检测试剂盒购自 DAKO 公司;ECM1 抗体由 Ni J 博士惠赠。

1.2 方法 蜡块标本切片,厚 4 μm/张;免疫组化染色采用 EnVision 两步法,主要步骤如下:切片脱蜡;微波煮沸抗原修复 10 min;3% H₂O₂ 阻断内源性过氧化酶 10 min;滴加 ECM1 抗体(1:300)孵育 30 min;滴加 EnVision™ 孵育 30 min;DAB 显色,苏木精复染,透明封片。结果判定:在双盲的情况下由两名病理科医师对每张切片进行全面的观察,棕褐色为表达阳性细胞,按阳性染色细胞数所占比例分为:(-):阳性细胞数<10%;(+):阳性细胞数 10%~30%;(++):阳性细胞数 30%~60%;(+++):阳性细胞数 60%~100%。

1.3 统计学处理 SPSS10.0 统计软件分析数据,采用 χ^2 检验。

2 结 果

经免疫组化 EnVision 方法检测,以光镜下+~+++判为阳性标本,各种组织 ECM1 的表达如下:正常肝组织阳性率 20.0%(4/20),肝癌组织阳性率 85.4%(70/82);正常乳腺组织阳性率 9.1%(1/11),乳腺癌组织阳性率 60.0%(18/30),其中淋巴

结(-)者为 37.5%(6/16),淋巴结(+)者为 85.7%(12/14);正常直肠组织阳性率 11.8%(2/17),直肠癌组织阳性率 54.5%(18/33),其中淋巴结(-)者为 33.3%(6/18),淋巴结(+)者为 80.0%(12/15)。统计分析结果表明,对 ECM1 的表达,肿瘤组织明显高于正常组织,转移性肿瘤明显高于非转移性肿瘤($P<0.01$),见表 1。此结果表明,ECM1 在肿瘤组织中过表达,在转移性肿瘤中表达更高,ECM1 分子的表达与肿瘤及肿瘤的转移相关。各种组织 ECM1 表达的典型镜下观察见图 1。

表 1 ECM1 在不同组织中的表达

Tab 1 Expression of ECM1 in different tissues

Histological type	N	ECM1		Positive rate(%)
		(-)	(+~+++)	
Liver				
Normal liver	20	16	4	20.0
Liver cell carcinoma	82	12	70	85.4**
Breast				
Normal breast	11	10	1	9.1
Breast cancer	30	12	18	60.0**
Lymph node metastasis(+)	14	2	12	85.7 $\Delta\Delta$
Lymph node metastasis(-)	16	10	6	37.5
Colon				
Normal colon	17	15	2	11.8
Colon cancer	33	15	18	54.5**
Lymph node metastasis(-)	15	3	12	80.0 $\Delta\Delta$
Lymph node metastasis(+)	18	12	6	33.3

** $P<0.01$ vs normal tissue group; $\Delta\Delta P<0.01$ vs lymph node metastasis(-)

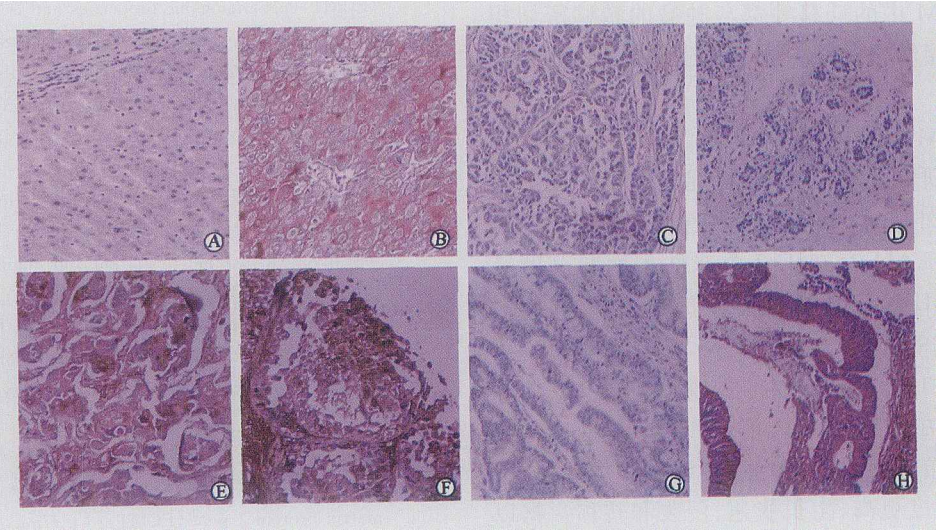


图 1 ECM 1 在各种正常组织和肿瘤组织中的表达

Fig 1 Expression of ECM1 in various normal and tumor tissues(EnVision, $\times 200$)

A: Normal liver(-); B: Liver cell carcinoma(++); C: Liver cell carcinoma(-);
D: Normal breast (-); E: Breast adenocarcinoma(++); F: Infiltrating ductal carcinoma(++);
G: Colon adenocarcinoma(-); H: Colon adenocarcinoma(++)

3 讨论

ECM1是从鼠的成骨基质细胞系MN7中分离出来的一种相对分子质量为85 000的分泌性糖蛋白,之所以这样命名是因为该蛋白被发现存在于各种结缔组织蛋白中,包括胶原蛋白、骨连接素和骨唾液蛋白,尽管当时并不知道它是否与细胞外基质在生理和病理上有相关性。ECM1基因有3个不同的剪切体ECM1a、ECM1b和ECM1c,分别编码540、415和559个氨基酸的蛋白质。ECM1a可表达于各种组织,但基因表达最丰富的是胎盘和心脏,ECM1b为限制性表达模式,仅在扁桃体和角化细胞中可检测到,而ECM1c的表达现仍未确定,但在皮肤中约占ECM1 RNA的15%^[3,4]。对于ECM1功能的研究,目前主要集中该分子在骨及皮肤中作用的研究,如现已发现ECM1是一种软骨内骨形成的负调节因子,可抑制碱性磷酸酶的活性和骨的矿化^[5];ECM1基因定位在染色体1q21的邻近表皮分化复合体区,ECM1可能在角化细胞分化中起作用;ECM1基因的功能性缺失可导致类脂蛋白沉积症的发生^[6];硬化性苔癣患者血清中存在高滴度的ECM1自身抗体,提示ECM1可能是硬化性苔癣患者体液免疫的一个作用靶点^[7]。

目前已知ECM在肿瘤的发生、发展及转移等方面有重要作用,尤其是在肿瘤的转移中。一方面ECM能影响肿瘤细胞的增殖、转移,另一方面肿瘤细胞与ECM的黏附、肿瘤细胞对ECM的侵袭及肿瘤细胞在ECM中的迁移等都与肿瘤的转移密切相关。此外,肿瘤转移过程中血管的生成与ECM也有重要的联系。

对于ECM1与肿瘤的关系,目前的研究资料极少,Han等^[2]研究发现,ECM1可促进血管内皮细胞的增殖(在体外培养中)和血管的生成(在鸡胚中),同时还证明ECM1存在于2个恶性程度较高的乳腺癌细胞系MDA-435和LCC15的基质中,而相对恶性程度较低的乳腺癌细胞系MCF-7、SK-BR3等则不表达ECM1。已知血管的生成是肿瘤发展的一个重要因素,在血管形成之前,大多数肿瘤相对较小,保持在原位,生长缓慢。然而,当血管生成后,肿瘤变得恶性程度更高,生长快速、侵袭和转移。据以上分析,ECM1很可能与肿瘤的发生和转移有某种关联性。

本实验结果表明,ECM1表达的阳性率在肝脏、乳腺和直肠的肿瘤组织明显高于其正常组织($P < 0.01$),乳腺癌和直肠癌淋巴结转移组明显高于未转

移组($P < 0.01$),由此可认为ECM1在肿瘤组织中过表达,并且与肿瘤的转移相关,但ECM1在其中到底发挥了怎样的作用,或这种相关仅仅是种附带现象,目前还无这方面的研究资料,这些还需要进一步研究确认。值得注意的是,对染色标本的镜下观察发现,ECM1的表达有很强的异质性,即使在同一张ECM1切片中着色也不同,一些肿瘤细胞着色很深,而其他肿瘤细胞着色浅甚至根本就不着色,阳性细胞的所占比例也不一。鉴于Han等研究乳腺癌细胞系的发现,我们推测表达ECM1的肿瘤细胞可能比不表达ECM1的肿瘤细胞有更强的侵袭性,恶性程度更高。我们还发现在许多切片中,尽管肿瘤细胞表达高水平的ECM1,但多被限制在肿瘤细胞的胞质或细胞周围。

综上所述,ECM1在一些肿瘤中过表达,尤其是那些转移性肿瘤,ECM1也许可作为一个肿瘤的标志分子,对肿瘤的诊断、治疗、监控、预后等有重要价值,而且由于ECM1是一种分泌性糖蛋白,患者血清中的ECM1浓度可能与某种类型肿瘤的存在或转移相关联,这些都还有待于进一步地深入研究。

参考文献

- [1] Mathieu E, Meheus L, Raymackers J, et al. Characterization of the osteogenic stromal cell line MN7: identification of secreted MN7 proteins using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, Western blotting and microsequencing[J]. *J Bone Miner Res*, 1994, 9(6): 903-913.
- [2] Han Z, Ni J, Smits P, et al. Extracellular matrix protein 1 (ECM1) has angiogenic properties and is expressed by breast tumor cells[J]. *FASEB J*, 2001, 15(6): 988-994.
- [3] Smits P, Ni J, Feng P, et al. The human extracellular matrix gene 1 (ECM1): genomic structure, cDNA cloning, expression pattern, and chromosomal localization[J]. *Genomics*, 1997, 45(3): 487-495.
- [4] Mongiat M, Fu J, Oldershaw R, et al. Perlecan protein core interacts with extracellular matrix protein 1 (ECM1), a glycoprotein involved in bone formation and angiogenesis[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17491-17499.
- [5] Deckers MM, Smits P, Karperien M, et al. Recombinant human extracellular matrix protein 1 inhibits alkaline phosphatase activity and mineralization of mouse embryonic metatarsals *in vitro*[J]. *Bone*, 2001, 28(1): 14-20.
- [6] Hamada T, McLean WH, Ramsay M, et al. Lipoid proteinosis maps to 1q21 and is caused by mutations in the extracellular matrix protein 1 gene (ECM1)[J]. *Hum Mol Genet*, 2002, 11(7): 833-840.
- [7] Oyama N, Chan I, Neill SM, et al. Autoantibodies to extracellular matrix protein 1 in lichen sclerosis[J]. *Lancet*, 2003, 362(9378): 118-123.

[收稿日期] 2004-07-26

[修回日期] 2004-10-08

[本文编辑] 曹 静