

DOI:10.3724/SP.J.1008.2008.01409

• 短篇论著 •

## Axin 与 MMP-14 在食管鳞癌中的表达及与浸润转移的关系

Association of Axin and MMP-14 expression with infiltration and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma

张欣, 张会超, 郭建文, 刘江惠, 左连富\*

河北医科大学第四医院肿瘤研究所流式细胞室, 石家庄 050011

**[摘要]** 目的:探讨 Axin 蛋白和 MMP-14 蛋白在食管鳞癌中的表达及与浸润转移的关系以及两者表达的相关性。方法:采用免疫组织化学(SP)法对 72 例食管鳞癌标本中 Axin 蛋白和 MMP-14 蛋白的表达进行了检测。结果:食管鳞癌中 Axin 蛋白的阳性表达率仅为 38.9%,在有纤维膜浸润食管癌中的表达明显低于无纤维膜浸润者( $P < 0.05$ );有淋巴结转移组的表达明显低于无淋巴结转移组( $P < 0.05$ )。食管鳞癌中 MMP-14 蛋白的阳性表达率为 62.5%,在高分化的食管鳞癌组织中的表达明显低于中低分化者( $P < 0.05$ );在有纤维膜浸润食管癌中的表达明显高于无纤维膜浸润者( $P < 0.05$ );有淋巴结转移组的表达明显高于无淋巴结转移组( $P < 0.01$ )。食管鳞癌 Axin 和 MMP-14 的表达具有相关性( $P < 0.05$ )。结论:Axin 蛋白的低表达和 MMP-14 蛋白的高表达与食管鳞癌的浸润及转移均有关,二者表达呈负相关,有望成为判断食管鳞癌的转移潜能及预后的有效指标。

**[关键词]** Axin;MMP-14;食管肿瘤;免疫组织化学;Wnt 通路

**[中图分类号]** R 735.1 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2008)11-1409-03

食管癌发生和浸润转移机制是当今研究的热点之一。Wnt 通路是一条对控制胚胎发育起重要作用的信号途径,近年来发现 Wnt 通路的异常激活与人类多种肿瘤的发生密切相关<sup>[1]</sup>。Axin 是 Wnt 信号转导通路负调节因素, MMP-14 可能作为 Wnt 信号转导通路的下游靶基因而受其调节<sup>[2]</sup>。现已发现多种肿瘤的发生和某些肿瘤的浸润转移与 Axin 和 MMP-14 蛋白异常表达有密切关系<sup>[3-6]</sup>,但食管鳞癌中 Axin 与 MMP-14 异常表达的关系及意义尚不清楚。本实验旨在探讨 Axin 和 MMP-14 蛋白的表达与食管鳞癌分化程度、侵袭和转移的关系及二者间的相关性。

### 1 资料和方法

1.1 标本来源及临床资料 72 例食管癌标本均来自河北医科大学第四医院病理科 2006~2007 年手术切除食管癌组织,且经病理证实均为食管鳞状细胞癌。患者术前均未接受过放、化疗。其中男 50 例,女 22 例,年龄 39~76 岁,中位年龄 59.2 岁。按 1990 年 WHO 食管癌的诊断标准:高分化 19 例,中、低分化 53 例;浸润至纤维膜 47 例,未浸润至纤维膜 25 例;有淋巴结转移 27 例,无淋巴结转移 45 例。

1.2 主要试剂 兔抗人 Axin(H-98)多克隆抗体(SC-14029),兔抗人 MMP-14(ZA-0339)多克隆抗体均购自 Santa Cruz 生物技术公司,SP 免疫组织化学试剂盒(SP-9000)和

DAB 酶底物显色试剂盒(ZLI-9032)购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 实验方法 免疫组化采用 SP 法。所有标本经常规石蜡包埋,5  $\mu\text{m}$  层厚连续切片,常规脱蜡,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  10 min 阻断内源性过氧化物酶,正常山羊血清室温封闭 25 min, Axin (1:50)、MMP-14(1:100)一抗湿盒中孵育,4 $^\circ\text{C}$  过夜, PBS 充分洗涤,生物素化羊抗兔二抗 37 $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 充分洗涤,辣根酶标记链霉卵白素 37 $^\circ\text{C}$  孵育 30 min, PBS 充分洗涤, DAB 显色,苏木精复染,脱水、透明、中性树脂封片,光镜下观察。以 PBS 代替一抗作为阴性对照,以正常食管组织为阳性对照。

1.4 结果判定 Axin 正常阳性表达定位于细胞质。根据 Nakajima 等<sup>[7]</sup>在食管鳞癌中的评价方法及本实验的情况,将无着色和阳性细胞数  $< 40\%$  定为阴性表达,阳性细胞数  $\geq 40\%$  为阳性表达。参照文献<sup>[8]</sup>的判定标准, MMP-14 免疫组化阳性物质主要分布于细胞质,少量间质也有着色,每张切片随机选取 10 个高倍视野,每个视野计数 100 个细胞,计数阳性细胞百分比。将无着色和阳性细胞数  $< 10\%$  定为阴性表达,阳性细胞数  $\geq 10\%$  为阳性表达。

1.5 统计学处理 采用 SPASS 12.0 统计软件进行数据处理,组间差异进行  $\chi^2$  检验,所有假设检验用双侧检验,检验水准  $\alpha = 0.05$ ,以  $P < 0.05$  认为差异有统计学意义。

**[收稿日期]** 2008-04-13 **[接受日期]** 2008-06-10

**[基金项目]** 河北省普通高等学校强势特色学科肿瘤学建设经费(冀教高[2005]52号)。Supported by Grant for Tumor Reseach of Special Subject of Higher Education of Hebei Province(Jijiaogao[2005]52)。

**[作者简介]** 张欣,硕士。E-mail:purple1113@163.com

\* 通讯作者(Corresponding author)。Tel:0311-86095337, E-mail:zuolianfu4909@sina.com

2 结果

2.1 食管鳞癌组织中 Axin、MMP-14 表达与临床、病理特征间的关系 Axin 蛋白染成棕黄色,主要分布在细胞质中,分布较均匀(图 1A、1C)。食管鳞癌中 Axin 的阳性表达率为 38.9%(28/72),本实验没有检测到 Axin 在细胞核的表达。有纤维膜浸润的病例中 Axin 的阳性表达率明显低于无纤维膜浸润的病例( $P < 0.05$ ),有淋巴结转移病例明显低于无淋

巴结转移病例( $P < 0.05$ )。但 Axin 的阳性表达率与患者性别、年龄、肿瘤分化程度均无关( $P > 0.05$ )。食管鳞癌中 MMP-14(图 1B、1D)的阳性表达率为 62.5%(45/72),中低分化的食管鳞癌组织中 MMP-14 的表达明显高于高分化的病例( $P < 0.05$ );有纤维膜浸润的病例明显高于无纤维膜浸润者( $P < 0.05$ );有淋巴结转移的病例明显高于无淋巴结转移者( $P < 0.01$ );MMP-14 的阳性表达率与患者的性别、年龄均无关( $P > 0.05$ ,表 1)。

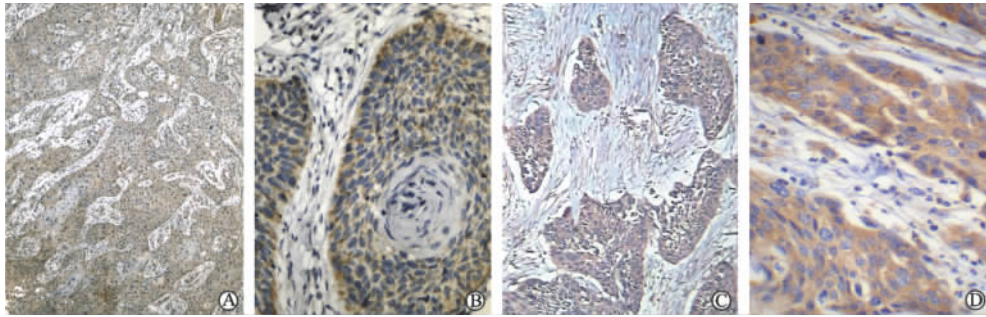


图 1 Axin 和 MMP-14 蛋白在食管鳞癌中的表达

A: Axin 在高分化癌组织中阳性表达;B: MMP-14 在高分化癌组织中阳性表达;C: Axin 在低分化癌组织中阳性表达;D: MMP-14 在低分化癌组织中阳性表达。Original magnification:  $\times 200$ (A,C);  $\times 400$ (B,D)。

2.2 Axin 与 MMP-14 在食管鳞癌中表达的相关性 在 MMP-14 蛋白阳性表达的病例中, Axin 阳性表达率仅为 28.9%(13/45),明显低于 MMP-14 蛋白阴性表达的病例 55.6%(15/27),二者呈负相关( $\chi^2 = 5.049, P = 0.025$ )。

维膜浸润者,这说明在食管鳞癌中, Axin 的低表达可能减弱了 Axin/APC/GSK-3 $\beta$  复合物对  $\beta$ -catenin 蛋白的降解作用,导致  $\beta$ -catenin 在细胞质的异常蓄积,从而激活下游靶基因 MMP-7<sup>[9]</sup>,通过降解细胞外基质促进肿瘤的浸润。

3 讨论

Axin 是一种重要的支架蛋白(scaffold),同时参与调节 Wnt 和 JNK 等信号转导通路, Axin1 基因的突变可能使 Axin 蛋白功能异常或表达减少,进而使 Axin 降低或失去了参与形成 APC 多蛋白复合体、介导  $\beta$ -catenin 降解的功能。本研究结果显示在 72 例食管鳞癌中 Axin 的阳性表达率仅为 38.9%,有纤维膜浸润病例中 Axin 的阳性率明显低于无纤

此外,本研究中 Axin 的表达与淋巴结转移相关,而与肿瘤的分化程度不相关,这与 Nakajima 等<sup>[7]</sup>在食管癌中研究是一致的,郑亚民等<sup>[10]</sup>在胃癌中也得出了类似的结论,提示 Axin 可能在肿瘤晚期的浸润、转移过程中起重要作用。研究发现 Axin 不仅在细胞质内表达,还可能作为  $\beta$ -catenin 的分子伴侣,通过穿梭于胞质、胞核调节  $\beta$ -catenin 的分布<sup>[11]</sup>,但本实验中未证实 Axin 在细胞核的表达,其机制有待进一步研究。

表 1 Axin、MMP-14 蛋白表达与食管鳞癌患者临床、病理特征间的关系

| 指标        | 例数 | Axin |    |       |       | MMP-14 |    |       |       |
|-----------|----|------|----|-------|-------|--------|----|-------|-------|
|           |    | +    | -  | 阳性率/% | P 值   | +      | -  | 阳性率/% | P 值   |
| 性别        |    |      |    |       |       |        |    |       |       |
| 男         | 50 | 19   | 31 | 38.0  | 0.816 | 29     | 21 | 58.0  | 0.234 |
| 女         | 22 | 9    | 13 | 40.9  |       | 16     | 6  | 72.7  |       |
| 年龄(岁)     |    |      |    |       |       |        |    |       |       |
| <59       | 31 | 11   | 20 | 35.5  | 0.606 | 20     | 11 | 64.5  | 0.759 |
| $\geq 59$ | 41 | 17   | 24 | 41.5  |       | 25     | 16 | 61.0  |       |
| 病理分级      |    |      |    |       |       |        |    |       |       |
| 高分化       | 19 | 9    | 10 | 47.4  | 0.342 | 8      | 11 | 42.1  | 0.032 |
| 中低分化      | 53 | 19   | 34 | 35.8  |       | 37     | 16 | 69.8  |       |
| 纤维膜浸润     |    |      |    |       |       |        |    |       |       |
| 有         | 47 | 14   | 33 | 29.8  | 0.030 | 34     | 13 | 72.3  | 0.018 |
| 没有        | 25 | 14   | 11 | 56.0  |       | 11     | 14 | 44.0  |       |
| 淋巴结转移     |    |      |    |       |       |        |    |       |       |
| 有         | 27 | 6    | 21 | 22.2  | 0.025 | 23     | 4  | 85.2  | 0.002 |
| 没有        | 45 | 22   | 23 | 48.9  |       | 22     | 23 | 48.9  |       |

MMP-14 是 MMPs 家族中的一个亚家族, 是一种跨膜蛋白, 具有降解细胞外基质的能力, 是 MMP-2 的主要激活物, 而 MMP-2 是促进肿瘤侵袭转移的主要金属蛋白酶之一。Yamashita 等<sup>[6]</sup>证实 MMP-14 在食管癌的进展期起关键作用。本研究结果表明 MMP-14 的表达与食管鳞癌的分化程度、浸润深度及淋巴结转移均相关, 提示 MMP-14 可能在食管鳞癌的发展、浸润转移中起重要作用。Takahashi 等<sup>[2]</sup>研究发现: 当把野生型的 APC 转导到 SW480 细胞后, 细胞内的  $\beta$ -catenin 水平下降, 其下游至少 84 个基因下调, MMP-14 便是其中之一。本资料结果显示 MMP-14 与 Axin 的表达呈负相关, 提示在食管鳞癌中 Axin 的低表达可能通过增加  $\beta$ -catenin 胞内含量而上调其下游靶基因 MMP-14。

综上所述, Axin 的表达与食管鳞癌的浸润深度、淋巴结转移及与 MMP-14 的表达均呈负相关, MMP-14 的表达与分化程度呈负相关, 与浸润深度及淋巴结转移呈正相关。因此, 检测食管鳞癌组织中 Axin 和 MMP-14 的表达, 不仅可以较好地评估肿瘤的转移潜能及判断预后, 也为肿瘤的治疗提供了新的思路。

#### [参 考 文 献]

- [1] Karim R, Tse G, Putti T, Scolyer R, Lee S. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers[J]. *Pathology*, 2004, 36: 120-128.
- [2] Takahashi M, Tsunoda T, Seiki M, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of membrane-type matrix metalloproteinase-1 as a target of the  $\beta$ -catenin/Tcf4 complex in human colorectal cancers[J]. *Oncogene*, 2002, 21: 5861-5867.
- [3] Ishizaki Y, Ikeda S, Fujimori M, Shimizu Y, Kurihara T, Itamoto T, et al. Immunohistochemical analysis and mutational analyses of beta-catenin, Axin family and APC genes in hepatocellular carcinomas[J]. *Int J Oncol*, 2004, 24: 1077-1083.
- [4] Kudo J, Nishiwaki T, Haruki N, Ishiguro H, Shibata Y, Terashita Y, et al. Aberrant nuclear localization of beta-catenin without genetic alterations in beta-catenin or Axin genes in esophageal cancer[J]. *World J Surg Oncol*, 2007, 5: 21-30.
- [5] 姚广裕, 杨名添, 戎铁华, 何 萍. MT1-MMP 在乳腺癌组织中的表达及临床意义[J]. *癌症*, 2004, 23(S1): 1482-1486.
- [6] Yamashita K, Tanaka Y, Mimori K, Inoue H, Mori M. Differential expression of MMP and uPA systems and prognostic relevance of their expression in esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2004, 110: 201-207.
- [7] Nakajima M, Fukuchi M, Miyazaki T, Masuda N, Kato H, Kuwano H. Reduced expression of Axin correlates with tumor progression of esophageal squamous cell carcinoma[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88: 1734-1739.
- [8] Yamamoto H, Adachi Y, Itoh F, Iku S, Matsuno K, Kusano M, et al. Association of matrilysin expression with recurrence and poor prognosis in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 3313-3316.
- [9] Saeki H, Tanaka S, Sugimachi K, Kimura Y, Miyazaki M, Ohga T, et al. Interrelation between expression of matrix metalloproteinase 7 and beta-catenin in esophageal cancer[J]. *Dig Dis Sci*, 2002, 47: 2738-2742.
- [10] 郑亚民, 李 非, 董承伟, 伍晓汀. 胃癌组织 Axin 蛋白的表达与侵袭转移的相关性[J]. *世界华人消化杂志*, 2006, 14: 763-766.
- [11] Cong F, Varmus H. Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates sub cellular localization of beta-catenin [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2882-2887.

[本文编辑] 孙 岩, 尹 茶