

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.00563

EMMPRIN、MMP-7 蛋白表达与子宫内膜癌侵袭转移的关系

Association of EMMPRIN and MMP-7 protein expression with endometrial cancer invasion and metastasis

李红艳^{1,2}, 王 蓁^{1*}, 田瑞云², 曹文荣²

1. 青岛大学医学院附属医院妇科, 青岛 266100

2. 青岛市第八人民医院妇科, 青岛 266100

[摘要] **目的** 探讨细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(EMMPRIN)、细胞外基质金属蛋白酶(MMP)-7 表达与子宫内膜癌侵袭转移的关系。**方法** 收集对照组(包括 11 例增生期子宫内膜, 11 例分泌期子宫内膜, 11 例单纯性增生子宫内膜, 11 例复杂性增生子宫内膜)、不典型增生组(51 例)和子宫内膜癌组(82 例)子宫内膜标本, 应用免疫组化法测定标本中 EMMPRIN 和 MMP-7 的表达, 采用 SAS 6.12 软件比较 EMMPRIN 和 MMP-7 阳性表达率在 3 组间的差异, 并分析 EMMPRIN 和 MMP-7 蛋白表达与子宫内膜癌临床病理特征的关系。**结果** 对照组、不典型增生组、子宫内膜癌组 EMMPRIN 和 MMP-7 的阳性表达率分别为 9.09%(4/44)和 6.82%(3/44)、43.13%(22/51)和 41.17%(21/51)、59.76%(49/82)和 61.00%(50/82), 组间差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同年龄、不同原发肿瘤大小的子宫内膜癌患者间 EMMPRIN、MMP-7 的表达差异无统计学意义, 但不同组织学分级、淋巴结转移与否患者间 EMMPRIN、MMP-7 的表达差异有统计学意义($P < 0.05$)。Spearman 等级相关性检验分析表明子宫内膜癌组织中 EMMPRIN 的表达和 MMP-7 的表达正相关($r = 0.863, P < 0.01$)。**结论** EMMPRIN 和 MMP-7 与子宫内膜癌的发生、发展及侵袭转移有关, 可能协同促进了子宫内膜癌的淋巴结转移。

[关键词] 细胞外基质金属蛋白酶诱导因子; 基质金属蛋白酶 7; 子宫内膜肿瘤; 肿瘤转移; 肿瘤浸润

[中图分类号] R 737.33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)05-0563-04

子宫内膜癌是最常见的妇科恶性肿瘤之一, 其发病机制仍不明确。细胞外基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, EMMPRIN)是免疫球蛋白超家族的成员, 主要功能是参与细胞与细胞之间的识别, 能显著地诱导基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的产生, 对多种肿瘤生长和转移相关的肿瘤细胞特性具有调节作用, 且与肿瘤侵袭转移、复发和预后密切相关。MMPs 是一类依赖 Zn^{2+} 和 Ca^{2+} 并可降解细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的蛋白水解酶类。MMP-7 是 MMPs 家族中相对分子质量最小的成员, 在正常的子宫内膜中, 多数 MMPs 几乎仅表达于间质细胞, 只有 MMP-7 表达于上皮细胞^[1], 并受雌、孕激素的调节。有研究报道 MMP-7 在子宫内膜样腺癌中高表达, 且 MMP-7 被认为是引起子宫内膜癌细胞侵袭以及转移的关键^[2]。EMMPRIN 在人类子宫内膜癌中的表达及其与 MMP-7 的关系尚未见报道。因此, 我们应用免疫组织化学方法检测了子宫内膜癌组织中 EMMPRIN 和 MMP-7 蛋白的表达, 探讨两者与子宫内膜癌临床病理学的关系及其临床意义。

1 材料和方法

1.1 标本收集 收集 2008 年 5 月至 2010 年 5 月就诊于青岛大学医学院附属医院的 82 例子宫内膜癌患者标本, 以及同期在我院经诊刮或全子宫切除获取的 11 例增殖期子宫内

膜、11 例分泌期子宫内膜、11 例单纯性增生子宫内膜、11 例复杂性增生子宫内膜、51 例不典型增生子宫内膜标本。所有蜡块在抽取前均给予复片, 挑选最富于肿瘤细胞的蜡块进行切片。

根据国际妇产科联盟(FIGO, 2000)子宫内膜癌临床分期标准, 82 例患者分别为: I a 期 14 例(G_1 5 例, G_2 4 例, G_3 5 例), I b 期 36 例(G_1 17 例, G_2 13 例, G_3 6 例), I c 期 15 例(G_1 5 例, G_2 3 例, G_3 7 例); II a 期 8 例(G_1 1 例, G_2 2 例, G_3 5 例); III c 期 9 例(G_1 2 例, G_2 2 例, G_3 5 例)。病理证实组织类型均为子宫内膜样腺癌。根治性子宫切除和盆腔淋巴结切除术后, 病理检查证实其中 11 例(13.4%)患者有盆腔淋巴结转移。

1.2 免疫组化染色检测 EMMPRIN 和 MMP-7 表达 EMMPRIN(兔抗人)多克隆抗体和 MMP-7(鼠抗人)单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术公司(工作液浓度 1:50), EnVision 两步法免疫组化试剂盒购自上海拜力生物科技有限公司, 显色剂 DAB 购自 DAKO 公司。采用 EnVision 两步法, 以 TBS 代替一抗作为阴性对照, 相应阳性切片作为阳性对照。操作按试剂盒说明书进行。

1.3 判定标准 采用免疫组化法检测 EMMPRIN 和 MMP-7, 镜下观察肿瘤细胞胞质和(或)胞膜出现棕黄色或褐色颗粒, 根据着色部位着色深浅程度及阳性细胞数量进行综合判定, 由 2 名经验丰富、副主任医师以上职称的病理科医师双

[收稿日期] 2011-03-01 **[接受日期]** 2011-04-15

[作者简介] 李红艳, 硕士生. E-mail: doctorli787@163.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0532-82911219, E-mail: mountain1963@163.com

盲法阅片,若结果不一致须重新判定。染色强度评分标准:不着色0分,黄色1分,棕黄色2分,黄褐色3分。阳性细胞所占比例评分标准:阳性细胞数<10%者0分,10%~40%者1分,40%~70%者2分,≥70%者3分。两者评分相加:0~1分为(-),2分为(+),3~4分为(++),5~6分(+++);≥3分计为阳性。

1.4 统计学处理 所有数据资料用SAS 6.12处理,采用χ²检验比较组间差异,Spearman等级相关性检验分析EMMPRIN和MMP-7蛋白的表达相关性。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 EMMPRIN和MMP-7蛋白在子宫内膜病变不同阶段的表达 免疫组化结果(图1)表明:EMMPRIN主要定位于肿瘤细胞质及胞膜,细胞周边最为明显,肿瘤侵袭前缘处的癌细胞染色增强;MMP-7主要定位于胞质。进一步定量分析结果(表1)表明:子宫内膜EMMPRIN和MMP-7过表达阳性率在子宫内膜癌组(59.76%和61.00%)高于不典型增生组(43.13%和41.17%,P<0.05)和对照组(9.09%和6.82%,P<0.01),不典型增生组高于对照组(P<0.01)。说明EMMPRIN和MMP-7随子宫内膜病变进展阳性率逐渐升高。

2.2 EMMPRIN和MMP-7蛋白表达与子宫内膜癌临床病理特征的关系 EMMPRIN和MMP-7蛋白在子宫内膜癌组织中的表达与患者年龄及肿瘤大小无关(P>0.05),而与子宫内膜癌组织的分化程度、有无淋巴转移有关(P<0.05)。EMMPRIN和MMP-7蛋白在低分化癌中的阳性表达率高于高、中分化癌(P<0.05);淋巴结转移组的阳性率高于无淋巴结转移组(P<0.05,表2)。

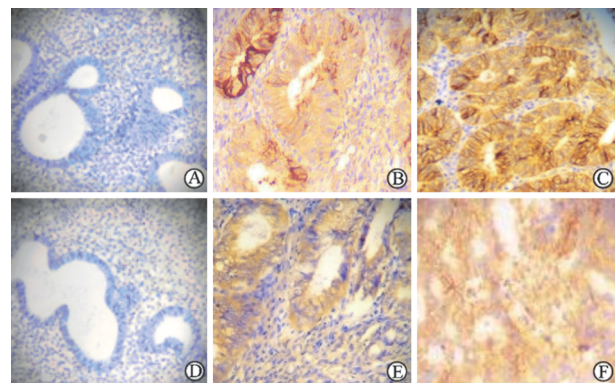


图1 EMMPRIN和MMP-7蛋白在正常子宫内膜组织、非典型增生子宫内膜和子宫内膜癌组织中的表达

A: EMMPRIN在正常子宫内膜呈阴性表达; B: EMMPRIN在非典型增生子宫内膜呈阳性表达(++); C: EMMPRIN在子宫内膜癌中呈强阳性表达(+++); D: MMP-7在正常子宫内膜呈阴性表达; E: MMP-7在非典型增生子宫内膜呈阳性表达(++); F: MMP-7在子宫内膜癌中呈强阳性表达(+++). Original magnification: ×100

表1 EMMPRIN和MMP-7蛋白在子宫内膜病变不同阶段的表达

无	71	31	40	56.3
---	----	----	----	------

组别	n	EMMPRIN			MMP-7		
		-	+	阳性率(%)	-	+	阳性率(%)
对照组	44	40	4	9.09	41	3	6.82
增殖期	11	10	1	9.09	10	1	9.09
分泌期	11	10	1	9.09	11	0	0
单纯性增生	11	10	1	9.09	10	1	9.09
复杂性增生	11	10	1	9.09	10	1	9.09
不典型增生	51	29	22	43.13**	30	21	41.17**
子宫内膜癌	82	33	49	59.76△	32	50	61.00△

** P<0.01与对照组比较; △P<0.05与不典型增生组比较

2.3 EMMPRIN和MMP-7蛋白表达的相关性 EMMPRIN和MMP-7在子宫内膜癌细胞中多同时表达,经Spearman等级相关性检验分析,结果表明子宫内膜癌组织中EMMPRIN的表达和MMP-7蛋白的表达正相关(r=0.863,P<0.01)。

3 讨论

EMMPRIN是一种广泛存在于细胞表面的糖蛋白,定位于染色体19q1313,参与机体多种生理和病理的过程,能通过促分裂原活化蛋白激酶(mitogen activated protein kinase, MAPK)途径诱导MMPs的产生,促进肿瘤的侵袭转移[3-5],通过血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)途径促进血管新生[6],通过诱导透明质烷(hyaluronan)产物促进肿瘤细胞耐药[7-8],通过抑制肿瘤细胞前凋亡相关蛋白(Bim)抑制肿瘤细胞巢式凋亡[9],还可通过激活细胞外信号调节激酶(ERK1/2)和p38 MAPKs来促进胰腺癌肿瘤细胞增殖[10]。肿瘤细胞侵袭转移主要表现在浸润前病变突破基底膜向浸润癌发展,浸润癌沿血管淋巴管向远处转移。基质降解是肿瘤细胞突破基底膜向远处侵袭进展的关键步骤。已有研究证实EMMPRIN诱导基质细胞产生MMPs,促进肿瘤细胞突破基底膜向周围及远处侵袭[5,11]。本研究发现从正常子宫内膜到不典型增生到子宫内膜癌,EMMPRIN表达强度及阳性率逐渐增加,这种表达模式符合子宫内膜癌的发生和发展特点,从而证实EMMPRIN在子宫内膜不典型增生向子宫内膜癌进展的过程中可能起着促进作用。

表2 EMMPRIN和MMP7蛋白表达与子宫内膜癌临床病理特征的关系

临床病理特点	N	EMMPRIN		
		-	+	阳性率(%)
年龄(岁)				
≤50	23	10	13	56.5
>50	59	22	37	62.7
肿瘤大小 d/cm				
≤5.0	49	15	34	69.4
>5.0	33	17	16	48.5
分化程度				
高	30	16	14	46.7*
中	24	11	13	54.2*
低	28	5	23	82.1
淋巴结转移				
有	11	1	10	90.9△
无	32	39	54.9	

* $P < 0.05$ 与低分化比较; $\Delta P < 0.05$ 与无淋巴转移比较

据文献报道,EMMPRIN在正常口腔黏膜和慢性口腔炎症黏膜主要在基底层表达,而在侵袭力强的口腔黏膜白斑不典型增生中表达增高,且随着不典型增生的程度增加而增加,在口腔浸润癌的原发灶和转移灶表达更高,因此,EMMPRIN在口腔癌的发生和发展中可能是一个早期事件,并且有可能促进肿瘤的发生^[12]。本研究中EMMPRIN表达明显随着子宫内膜病变进展而增加,在子宫内膜不典型增生中主要为弱阳性和中阳性表达,在伴有腺体累及主要集中在癌巢周围表达,在浸润癌表达则广泛增强,反映其侵袭能力逐渐增强。EMMPRIN在不典型增生累及腺体癌巢周围表达增强可能预示其进一步发展的倾向。另本研究证实EMMPRIN在促进子宫内膜癌细胞侵袭转移方面可能起着重要作用,在有盆腔淋巴结转移者,原发病灶EMMPRIN过表达显著高于无淋巴结转移者的原发病灶,显示这部分病例具有高侵袭性特点。EMMPRIN通过MMPs及VEGF等细胞因子促进肿瘤细胞侵袭转移,在多种肿瘤中表达增高。Riethdorf等^[13]用组织芯片免疫组化方法研究129种恶性肿瘤在2348例标本和76种正常组织在608例标本中的检出情况,结果发现,129种肿瘤中有112例表达增加,显著高于正常组织或良性肿瘤。我们的研究证实EMMPRIN的表达可能与子宫内膜增生的发生、发展及子宫内膜癌细胞的侵袭转移相关。研究表明,利用EMMPRIN促进肿瘤细胞侵袭转移的作用,反义抑制EMMPRIN表达可以抑制恶性胶质瘤肿瘤细胞侵袭及血管新生^[14];最近的临床I/II期试验用EMMPRIN抗体Iodine (¹³¹I)metuximab治疗肝癌患者安全有效^[15];利用RNA干扰抑制卵巢癌肿瘤细胞EMMPRIN表达,可以抑制其侵袭进展能力,并增加对泰素化疗的敏感性^[16]。因此EMMPRIN亦有望成为子宫内膜癌治疗的新靶标,有必要进一步研究EMMPRIN在子宫内膜增生症及子宫内膜癌发生、发展中的作用及其机制,为将来在靶向治疗方面提供新的思路。

子宫内膜癌的浸润转移是多步骤、多因素参与的复杂过程。多种相关基因的激活是导致肿瘤细胞发生浸润转移的重要因素,而肿瘤细胞对ECM成分及基底膜的降解是肿瘤浸润转移的关键步骤,此过程有赖于蛋白降解酶的表达和激活。MMPs是目前所知的蛋白降解酶之一,它可通过对ECM中不同成分的降解,在肿瘤浸润转移中起重要作用。MMP-7是MMPs家族中的一员,是由癌细胞自身产生的。Misugi等^[17]研究MMP-2、-7、-9和TIMP-1、-2在子宫内膜癌中的表达并将表达结果与临床病理比较,发现其在细胞质中均有表达,除MMP-9外,其余的在肿瘤细胞外围基质中也有表达。此外,MMP-7可激活前明胶酶MMP-2和-9^[18],高级别的子宫内膜癌中MMP-7的表达较低级别表达增强。研究还表明,TIMP-1和-2抑制了子宫内膜癌中癌细胞的侵袭,当MMP-7表达较高时,治愈的可能性减小。由此可见,晚期子宫内膜癌中MMP-7表达量增加与肿瘤侵袭和转移程度有关,在本研究中亦得以证实。

最近的研究表明,EMMPRIN不仅能够刺激成纤维细胞

表达MMPs,同时它也可以通过一种旁分泌的方式作用于血管内皮细胞,调节内皮细胞MMPs的表达,提示肿瘤源性的EMMPRIN可能通过调节内皮细胞MMPs的产生而参与肿瘤新生血管生成^[19-20]。在本研究中,子宫内膜癌组织中EMMPRIN和MMP-7蛋白表达强度呈密切正相关,两者的表达强度均随癌组织分化程度的降低而升高,并且EMMPRIN和MMP-7蛋白高表达的子宫内膜癌组织具有较高的侵袭、转移能力,据此可以认为检测子宫内膜癌组织中EMMPRIN和MMP-7蛋白的表达状况可能有助于判断子宫内膜癌的恶性程度及患者预后转归,值得进一步研究。

[参考文献]

- [1] Koks C A, Groothuis P G, Slaats P, Dunselman G A, de Goeij A F, Evers J L. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors in antegradely shed menstruum and peitoneal fluid[J]. *Fertil Steril*, 2000, 73: 604-612.
- [2] Misugi F, Sumi T, Okamoto E, Nobeyama H, Hattori K, Yoshida H, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in uterine endometrial carcinoma and a correlation between expression of matrix metalloproteinase-7 and prognosis[J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16: 541-546.
- [3] Yang J M, Xu Z, Wu H, Zhu H, Wu X, Hait W N. Overexpression of extracellular matrix metalloprotease inducer in multidrug resistant cancer cells[J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1: 420-427.
- [4] Rosenthal E L, Zhang W, Talbert M, Raisch K P, Peters G E. Extracellular matrix metalloprotease inducer-expressing head and neck squamous cell carcinoma cells promote fibroblast-mediated type I collagen degradation *in vitro* [J]. *Mol Cancer Res*, 2005, 3: 195-202.
- [5] Tang Y, Kesavan P, Nakada M T, Yan L. Tumor-stroma interaction: positive feedback regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) expression and matrix metalloproteinase-dependent generation of soluble EMMPRIN [J]. *Mol Cancer Res*, 2004, 2: 73-80.
- [6] Tang Y, Nakada M T, Kesavan P, McCabe F, Millar H, Rafferty P, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer stimulates tumor angiogenesis by elevating vascular endothelial cell growth factor and matrix metalloproteinases [J]. *Cancer Res*, 2005, 65: 3193-3199.
- [7] Marieb E A, Zoltan-Jones A, Li R, Misra S, Ghatak S, Cao J, et al. Emmprin promotes anchorage-independent growth in human mammary carcinoma cells by stimulating hyaluronan production [J]. *Cancer Res*, 2004, 64: 1229-1232.
- [8] Ghatak S, Misra S, Toole B P. Hyaluronan constitutively regulates ErbB2 phosphorylation and signaling complex formation in carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 8875-8883.
- [9] Yang J M, O'Neill P, Jin W, Foty R, Medina D J, Xu Z, et al. Extracellular matrix metalloproteinase inducer (CD147) confers resistance of breast cancer cells to Anoikis through inhibition of Bim [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281: 9719-9727.
- [10] Pushkarsky T, Yurchenko V, Vanpouille C, Brichacek B, Vais-

- man I, Hatakeyama S, et al. Cell surface expression of CD147/EMMPRIN is regulated by cyclophilin 60 [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280:27866-27871.
- [11] Sidhu S S, Mengistab A T, Tauscher A N, LaVail J, Basbaum C. The microvesicle as a vehicle for EMMPRIN in tumor-stromal interactions [J]. *Oncogene*, 2004, 23:956-963.
- [12] Nabeshima K, Iwasaki H, Koga K, Hojo H, Suzumiya J, Kikuchi M. Emmprin (basigin/CD147): matrix metalloproteinase modulator and multifunctional cell recognition molecule that plays a critical role in cancer progression [J]. *Pathol Int*, 2006, 56:359-367.
- [13] Riethdorf S, Reimers N, Assmann V, Kornfeld J W, Terracciano L, Sauter G, et al. High incidence of EMMPRIN expression in human tumors [J]. *Int J Cancer*, 2006, 119:1800-1810.
- [14] Liang Q, Xiong H, Gao G, Xiong K, Wang X, Zhao Z, et al. Inhibition of basigin expression in glioblastoma cell line via anti-sense RNA reduces tumor cell invasion and angiogenesis [J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4:759-762.
- [15] Chen Z N, Mi L, Xu J, Song F, Zhang Q, Zhang Z, et al. Targeting radioimmunotherapy of hepatocellular carcinoma with iodine¹³¹I metuximab injection: clinical phase I / II trials [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2006, 65:435-444.
- [16] Zou W, Yang H, Hou X, Zhang W, Chen B, Xin X. Inhibition of CD147 gene expression via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumorigenicity and increases chemosensitivity to paclitaxel in HO-8910pm cells [J]. *Cancer Lett*, 2007, 248:211-218.
- [17] Misugi F, Sumi T, Okamoto E, Nobeyama H, Hattori K, Yoshida H, et al. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinase in uterine endometrial carcinoma and a correlation between expression of matrix metalloproteinase-7 and prognosis [J]. *Int J Mol Med*, 2005, 16:541-546.
- [18] El Touny L H, Banerjee P P. Akt GSK-3 pathway as a target in genistein-induced inhibition of TRAMP prostate cancer progression toward a poorly differentiated phenotype [J]. *Carcinogenesis*, 2007, 28:1710-1717.
- [19] Caudroy S, Polette M, Nawrocki-Raby B, Cao J, Toole B P, Zucker S, et al. EMMPRIN-mediated MMP regulation in tumor and endothelial cells [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2002, 19:697-702.
- [20] Menashi S, Serova M, Ma L, Vignot S, Mourah S, Calvo F. Regulation of extracellular matrix metalloproteinase inducer and matrix metalloproteinase expression by amphiregulin in transformed human breast epithelial cells [J]. *Cancer Res*, 2003, 63:7575-7580.

[本文编辑] 孙岩