

DOI:10.3724/SP.J.1008.2011.01155

脑胶质瘤组织中 MMP-7、整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达及临床意义

Expression of MMP7 and integrin $\alpha v\beta 5$ in glioma and its clinical significance

季 列^{1,2}, 周范氏^{1*}

1. 复旦大学附属华山医院神经外科, 上海 200040

2. 上海市邮电医院神经外科, 上海 200040

[摘要] **目的** 观察人脑胶质瘤组织中 MMP-7 和整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达, 并探讨其可能的临床意义。**方法** 采用免疫组织化学 S-P 法, 检测 38 例不同病理分级脑胶质瘤和 13 例正常脑组织中 MMP-7 和整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达情况, 探讨二者表达的相关性。**结果** MMP-7 和整合素 $\alpha v\beta 5$ 在脑胶质瘤中阳性表达均高于正常脑组织 ($P < 0.01$)。MMP-7 蛋白表达水平与脑胶质瘤病理分级正相关 ($r = 0.426, P < 0.01$); 整合素 $\alpha v\beta 5$ 蛋白表达与病理分级正相关 ($r = 0.323, P < 0.05$)。人脑胶质瘤中 MMP-7 的表达水平与整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达水平正相关 ($r = 0.578, P < 0.01$)。**结论** MMP-7 和整合素 $\alpha v\beta 5$ 表达水平的测定可能有助于早期识别具有高度恶性的人脑胶质瘤并判断其预后。

[关键词] 基质金属蛋白酶 7; 整合素 $\alpha v\beta 5$; 脑肿瘤; 神经胶质瘤; 免疫组织化学

[中图分类号] R 739.41 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2011)10-1155-03

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的一类肿瘤, 约占成人颅内肿瘤的 40%~50%。其易复发、预后较差, 平均存活期从数月至数年不等。在脑胶质瘤侵袭、复发过程中, 各种蛋白分子起到重要的作用。整合素是细胞黏附分子中的一类, 其可调节细胞基质以及细胞与细胞间相互作用, 可改变肿瘤细胞的生物学行为。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是降解细胞外基质的水解蛋白酶家族, 激活的 MMPs 与肿瘤侵袭行为间有明显相关性^[1-2]。因此, 本研究采用免疫组织化学 S-P 法检测了不同病理分级胶质瘤组织中 MMP-7 及整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达水平, 并分析两者间的相关性, 探讨其在胶质瘤发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 一般资料 选取上海市邮电医院神经外科 2004 年 1 月至 2006 年 1 月手术切除的胶质瘤标本 38 例 (所选标本全部经病理证实)。全部病例术前均未接受放疗、化疗。按 WHO (2000 年) 神经系统肿瘤分类标准进行分级, 将 I~II 级归为低恶性组, III~IV 级为高恶性组。低恶性组 (I~II 级) 21 例, 高恶性组 (III~IV 级) 17 例。13 例正常脑组织取自同期急性颅脑损伤内减压术患者, 作为对照组。

1.2 主要试剂及仪器 兔抗人 $\alpha v\beta 5$ 多克隆抗体, 工作浓度为 1:50; 兔抗人 MMP-7 多克隆抗体, 工作浓度为 1:100, 以上试剂均为北京博奥森生物技术有限公司产品; S-P 免疫组化试剂盒和 DAB 显色试剂均购自武汉博士德生物技术有限公司。主要仪器有水浴锅、微波炉、显微镜等。

1.3 免疫组化 S-P 法 具体操作按说明书进行。石蜡包埋标本行 4 μm 层厚连续切片, 组织切片常规脱蜡、水化, 微波

修复抗原, 3% 过氧化氢室温处理 10 min, 正常羊血清封闭 15 min, 一抗 4℃ 孵育过夜, 生物素标记的二抗处理 15 min, 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶复合物处理 15 min, DAB 显色, 自来水冲洗终止反应, 苏木精复染, 脱水, 透明, 中性树脂封片, 以 PBS 代替一抗作空白对照, 正常脑组织作对照。

1.4 结果评定标准 染色结果判断标准: 整合素 $\alpha v\beta 5$ 阳性染色为棕黄色颗粒, 定位于细胞膜或细胞质。MMP-7 阳性细胞为细胞质有棕黄色颗粒着色的细胞。在 400 倍显微镜下观察, 每例组织切片任意选择 5 个视野, 统计阳性细胞的百分数。免疫组化染色结果参考 Fromowitz 方法判定^[3]: 首先在低倍镜下选择有代表性的区域, 然后在高倍镜下选 10 个视野 ($\times 400$), 每个视野下数 100 个肿瘤细胞, 计算阳性细胞百分比, 采用半定量积分法判断结果。评分方法参考文献^[4], (1) 着色强度: 无着色为 0 分, 淡黄色为 1 分, 棕黄色为 2 分, 棕褐色为 3 分; (2) 着色范围: $< 5\%$ 为 0 分, $5\% \sim 25\%$ 为 1 分, $26\% \sim 50\%$ 为 2 分, $51\% \sim 75\%$ 为 3 分, $> 75\%$ 为 4 分。两项结果相加 < 2 分为阴性 (-), $2 \sim 3$ 分为弱阳性 (+), $4 \sim 5$ 分为中度阳性 (++) , $6 \sim 7$ 分为强阳性 (+++)。以 (+, ++, +++) 均为阳性来定义阳性率。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 13.0 软件进行统计学分析, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用方差分析; 相关性分析应用 Spearman 相关分析, 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白在正常脑组织和胶质瘤中的表达 MMP-7 蛋白主要表达于细胞胞质, 阳性染色为棕黄色颗粒 (图 1A); $\alpha v\beta 5$ 蛋白主要定位于细胞膜, 少量表达于细胞

[收稿日期] 2011-07-08 **[接受日期]** 2011-09-20

[作者简介] 季 列, 硕士生, 主治医师。E-mail: boxstation@yahoo.com

* 通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-54052005, E-mail: 13901934772@139.com

质,阳性染色为棕黄色颗粒(图 1B)。MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 在高度恶性胶质瘤中的表达要高于低度恶性胶质瘤和正常脑组织(表 1)。

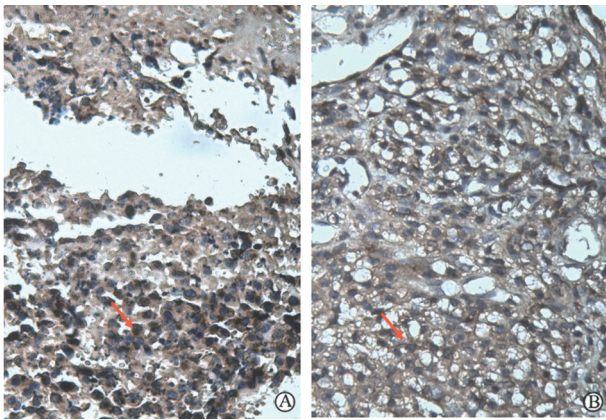


图 1 脑胶质瘤中 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白的表达
A: MMP-7; B: $\alpha v\beta 5$. Original magnification: X400

表 1 正常脑组织和胶质瘤中 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白的表达

(%)

组别	n	MMP-7 阳性率	$\alpha v\beta 5$ 阳性率
正常脑组织组	13	15.38±2.3	7.69±2.6
低恶性度组	21	42.86±4.7**	28.57±4.1**
高恶性度组	17	70.59±11.4** $\Delta\Delta$	58.82±8.9** $\Delta\Delta$

** $P < 0.01$ 与正常脑组织相比; $\Delta\Delta P < 0.01$ 与低恶性度组相比

2.2 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白阳性表达与病理分级的相关性 结果(表 2)表明:MMP-7 表达与胶质瘤的病理分级明显相关($r=0.426, P < 0.01$),而 $\alpha v\beta 5$ 表达与胶质瘤病理分级呈一定的相关性($r=0.323, P < 0.05$)。

表 2 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白表达与病理分级的相关性

(n)

病理分级	MMP-7				$\alpha v\beta 5$			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
I~II 级	12	7	2	0	15	5	1	0
III~IV 级	5	3	5	4	7	4	4	2

2.3 脑胶质瘤中 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白表达的相关性 Spearman 相关分析结果(表 3)表明:胶质瘤中 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白的表达具有相关性($r=0.578, P < 0.01$)。

表 3 脑胶质瘤中 MMP-7 和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白表达相关性分析

MMP-7	N	$\alpha v\beta 5$ (n)			
		-	+	++	+++
-	28	21	6	1	0
+	12	10	1	1	0
++	7	3	2	1	1
+++	4	0	1	2	1

合计	51	34	10	5	2
----	----	----	----	---	---

3 讨论

脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,新生血管形成和侵袭性生长是其主要的恶性生物学行为。近年来随着分子生物学技术的迅速发展,人们对脑胶质瘤有了进一步的认识,涉及到肿瘤内部的血管生成、细胞增殖、细胞黏附及迁移等方面。脑胶质瘤的侵袭是一个包括肿瘤细胞与宿主细胞及细胞外基质相互作用的复杂过程。而各种基质金属蛋白酶和黏附分子在脑胶质瘤侵袭性中发挥了重要的作用。

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)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^[5]的研究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。血管内皮细胞被肿瘤细胞破坏后,能分泌层粘连蛋白、纤维连接蛋白等细胞外基质。肿瘤细胞也可分泌降解 ECM 的酶及降解基底膜的酶,如基质金属蛋白酶等,有利于肿瘤细胞的

侵袭行为。近年来发现,脑胶质瘤细胞可分泌多种基质金属蛋白酶,在胶质瘤标本中也发现有基质金属蛋白酶含量升高^[6-8]。MMP-7是基质金属蛋白酶的一种,是Zn离子依赖性内肽酶,具有高度蛋白溶解能力,几乎能降解ECM的所有成分,可激活多种细胞外基质,并在肿瘤侵袭中发挥重要作用^[9-10]。本研究发现,MMP-7在脑胶质瘤中表达明显高于在正常脑组织中的表达,且在Ⅲ~Ⅳ级胶质瘤组织中表达又明显高于在Ⅰ~Ⅱ级胶质瘤中的表达($P < 0.01$),且表达量与胶质瘤的恶性程度正相关。此结果提示,MMP-7在脑胶质瘤高侵袭的恶性生物学行为中发挥了重要作用,其机制可能是脑胶质瘤过量表达MMP-7,其激活后降解了肿瘤细胞周围基质和脉管基底膜,使肿瘤细胞易于侵入周围组织和脉管系统。

整合素是介导细胞与细胞外间质(ECM)黏附作用的主要因素,是由 α 、 β 两条链在细胞表面通过非共价键连接而成的异二聚体跨膜糖蛋白,已发现有16种不同的 α 亚单位和8种 β 亚单位^[11-13]。目前认为 α 亚单位与基质特异性黏附有关, β 亚单位则可能与细胞的信号转导功能有关。不同的 $\alpha\beta$ 二聚体识别相同或不同的配体,包括层粘连蛋白、胶原蛋白、纤维连接蛋白等。整合素在细胞膜上与ECM蛋白形成复合体,即黏合斑(focal adhesion),这是细胞黏附于细胞外间质的基础,也是整合素介导信号转导的结构基础。整合素 $\alpha v\beta 5$ 是整合素膜受体家族中重要的一员,是一种具有多种功能的整合素分子,其在血管形成、肿瘤迁移、瘢痕及骨形成等过程中都起重要作用。本研究分析了整合素 $\alpha v\beta 5$ 在正常脑组织和不同病理级别脑胶质瘤中的表达,发现其在正常脑组织中几乎不表达,而在脑胶质瘤中有阳性表达,且随着脑胶质瘤病理级别的升高,整合素 $\alpha v\beta 5$ 表达水平明显增加,差异有统计学意义($P < 0.05$)。随着脑胶质瘤病理级别的升高,肿瘤细胞增殖活性增高,肿瘤的侵袭性和恶性程度明显增加,提示整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达可能与脑胶质瘤的主要恶性生物学行为有密切联系。

目前国内缺乏关于MMP-7和 $\alpha v\beta 5$ 蛋白在人脑胶质瘤中表达相关性的报道。本研究显示两者表达呈正相关关系($r = 0.578$, $P < 0.01$)。MMP-7表达水平高,则 $\alpha v\beta 5$ 蛋白表达水平也高;MMP-7表达水平低,则整合素 $\alpha v\beta 5$ 蛋白表达水平也低。MMP-7和整合素 $\alpha v\beta 5$ 都可以影响细胞的黏附连接,介导细胞与基底膜、细胞与细胞黏附,对肿瘤生长、浸润等生物学特性具有重要作用。

综上所述,根据本实验结果,我们认为MMP-7和整合素 $\alpha v\beta 5$ 除分别影响肿瘤特性外,MMP-7和整合素 $\alpha v\beta 5$ 的表达还可能互相作用,影响肿瘤的生长、侵袭,但这一观点尚需进一步研究。MMP-7和整合素 $\alpha v\beta 5$ 阳性表达率高提示肿瘤恶性程度高,因而联合检测两者的表达可能有助于预测人脑

胶质瘤的恶性程度和预后,对临床诊治具有重要的参考价值。

[参考文献]

- [1] Liotta L A, Steeg P S, Stetler-Stevenson W G. Cancer metastasis and angiogenesis; an imbalance of positive and negative regulation[J]. Cell, 1991, 64: 327-336.
- [2] Stetler-Stevenson W G. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis[J]. Cancer Metastasis Rev, 1990, 9: 289-303.
- [3] Fromowitz F B, Viola M V, Chao S, Oravez S, Mishriki Y, Finkel G, et al. RAS p21 expression in the progression of breast cancer[J]. Hum Pathol, 1987, 18: 1268-1275.
- [4] 许良中, 杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志, 1996, 6: 229-231.
- [5] Liotta L A, Kohn E C. The microenvironment of the tumour-host interface[J]. Nature, 2001, 411: 375-379.
- [6] 孙荣辉, 徐国政. VEGF、MMP-9在人脑胶质瘤中的表达及其意义[J]. 中国临床神经外科杂志, 2010, 15: 273-277.
- [7] Veeravalli K K, Chetty C, Ponnala S, Gondi C S, Lakka S S, Fassett D, et al. MMP-9, uPAR and cathepsin B silencing downregulate integrins in human glioma xenograft cells *in vitro* and *in vivo* in nude mice[J]. PLoS One, 2010, 5: e11583.
- [8] Wang M, Wang T, Liu S, Yoshida D, Teramoto A. The expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in human gliomas of different pathological grades[J]. Brain Tumor Pathol, 2003, 20: 65-72.
- [9] Yan W, Zhang W, Sun L, Liu Y, You G, Wang Y, et al. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme[J]. Brain Res, 2011, 1411: 108-115.
- [10] Iwamoto F M, Hottinger A F, Karimi S, Riedel E, Dantis J, Jahdi M, et al. Longitudinal prospective study of matrix metalloproteinase-9 as a serum marker in gliomas[J]. J Neurooncol, 2011 Jun 28. [Epub ahead of print]
- [11] Tabatabai G, Tonn J C, Stupp R, Weller M. The role of integrins in glioma biology and anti-glioma therapies [J]. Curr Pharm Des, 2011 Aug 9. [Epub ahead of print]
- [12] 马进, 范志宏. 整合素的研究进展[J]. 上海第二医科大学学报, 2004, 1: 11-13.
- [13] Leblond P, Meignan S, Le Tinier F, Bethe U, Lansiaux A. The inhibitor of integrins Cilengitide: a new active drug in neuro-oncology[J]. Bull Cancer, 2011, 98: 1083-1090.
- [14] Bello L, Francolini M, Marthyn P, Zhang J, Carroll R S, Nikas D C, et al. Alpha(v)beta3 and alpha(v)beta5 integrin expression in glioma periphery[J]. Neurosurgery, 2001, 49: 380-389.

[本文编辑] 贾泽军