

# 乳腺癌基质金属蛋白酶 13 蛋白的表达及其与预后的关系

李春耕<sup>1</sup>, 李洪涛<sup>2\*</sup>

(1. 河北省唐山市中医院肛肠科, 唐山 063000; 2. 天津医科大学附属肿瘤医院乳腺一科, 天津 300070)

**[摘要]** **目的:**探讨基质金属蛋白酶 13(MMP-13)在乳腺癌中的表达情况及其与临床预后的关系。**方法:**采用组织芯片及免疫组化 SP 法检测了 183 例乳腺癌组织中 MMP-13 的表达水平,分析乳腺癌组织中 MMP-13 的表达情况与临床病理因素之间的相关性,并结合完整的 10 年随访资料探讨 MMP-13 与乳腺癌预后的关系。**结果:**乳腺癌组织中 MMP-13 的阳性表达率(54.1%)显著高于良性乳腺疾病(13.3%, $P<0.01$ )。MMP-13 的表达与临床 TNM 分期、淋巴结转移状态、组织学分级密切相关( $P<0.01$ ),而与肿瘤大小、年龄、月经状态、病理类型以及雌孕激素受体状态无关。MMP-13 高表达组 10 年生存率低于低表达组( $P<0.01$ )。**结论:**MMP-13 在乳腺癌中表达水平升高,其高表达预示预后不良。

**[关键词]** 乳腺肿瘤;基质金属蛋白酶 13;组织芯片;诊断;预后

**[中图分类号]** R 737.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2007)09-0960-04

## Expression of MMP-13 in breast cancer and its relationship with prognosis of breast cancer

LI Chun-geng<sup>1</sup>, LI Hong-tao<sup>2\*</sup> (1. Department of Anus-Intestine, Traditional Chinese Medicine Hospital of Tangshan, Tangshan 063000, China; 2. Department of Breast Diseases I, Cancer Hospital, Tianjin Medical University, Tianjin 300070)

**[ABSTRACT]** **Objective:** To investigate the expression of MMP-13 in breast cancer tissues and its relationship with clinical prognosis of patients. **Methods:** Tissue microarray and immunohistochemical SP method were used to detect the expression of MMP-13 in 183 specimens of breast cancer. The association between the expression of MMP-13 and the clinicopathologic parameters of patients was analyzed; the association between MMP-13 and the prognosis of breast cancer was also discussed based on 10 years' follow-up data. **Results:** The positive rate of MMP-13 in the breast cancer tissue (54.1%) was significantly higher than that in the benign breast tissues (13.3%,  $P<0.01$ ). MMP-13 expression was significantly correlated with the clinical TNM stage, histological grade and lymph node metastasis status of the malignancy ( $P<0.01$ ), but was not correlated with patients' age, tumor size, pathological type, period status, and the status of estrogen receptor and progesterone receptors. The 10-year survival rate of patients with over-expression of MMP-13 was lower than patients with low MMP-13 expression ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** MMP-13 expression is upregulated in breast cancer tissues, which is an indicator of poor prognosis of patients.

**[KEY WORDS]** breast neoplasms; matrix metalloproteinases-13; microarray; diagnosis; prognosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2007, 28(9): 960-963]

肿瘤的浸润和转移是导致乳腺癌患者预后不良的主要原因。大量研究<sup>[1-2]</sup>表明,在肿瘤的浸润和转移过程中,基质金属蛋白酶(MMP)家族起重要作用。目前对于这个家族的研究报道很多,但多数是关于 MMP-2、MMP-9 与肿瘤浸润转移及预后关系的报道,而对 MMP-13 的报道较少。本研究采用组织芯片及免疫组化 SP 法检测了 183 例乳腺癌组织中 MMP-13 的表达水平,并结合 10 年随访资料探讨 MMP-13 对乳腺癌患者预后的影响。

### 1 材料和方法

1.1 材料 收集天津医科大学附属肿瘤医院乳腺病理科 1993 年手术切除乳腺癌石蜡包埋标本 183 例。患者年龄 24~75 岁,中位年龄 48 岁。按 2003 年世界卫生组织(WHO)乳腺肿瘤组织学类型修订

方案,对全部资料进行统一命名和分类:浸润性导管癌 124 例,浸润性小叶癌 28 例,其他类型癌 31 例。临床分期 I 期 22 例,II 期 93 例,III~IV 期 68 例。组织学分级 I 级 67 例,II 级 57 例,III 级 59 例。有淋巴结转移者 97 例,无淋巴结转移者 86 例。对照组取自同期乳腺良性病变(乳腺囊性增生症)30 例。

#### 1.2 方法

1.2.1 制作组织芯片 (1)H-E 切片于显微镜下明确并标记癌巢。(2)借助 H-E 切片于供体蜡块的相应部位进行标记作为取材部位。(3)组织芯片模块

**[基金项目]** 河北省自然科学基金(052761689). Supported by Natural Science Foundation of Hebei Province (052761689).

**[作者简介]** 李春耕,主治医师. E-mail:lichungeng.love@163.com

\* Corresponding author. E-mail:lihongtao111111@126.com

制作:将普通病理石蜡熔化,反复沉淀3次,加入3%精制蜂蜡,制作4.0 cm×2.0 cm×1.0 cm大小的空白蜡块,室温冷却。(4)组织芯片的设计和制备:设计10×8点组织阵列,用打孔机制成模块,用直径0.6 mm的打孔针从供体蜡块的选定部位逐个取出组织芯,随即放入预先设计的阵列模块中,排列成组织芯片模块,将制成的组织芯片模块置于60℃温箱中50 min,轻压模块使组织芯片在模块中排平。将制成的模块常规切成4 μm的切片裱于硅化玻片上,60℃温箱过夜。

1.2.2 采用免疫组织化学SP法检测 鼠抗人MMP-13单克隆抗体购自北京中杉生物技术有限公司。SP试剂购自福州迈新生物技术开发有限公司,按说明书要求做抗原热修复处理。用已知阳性的乳腺癌组织切片作阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。

1.3 阳性结果判断标准 每张切片选择有代表性的区域,在400倍视野下进行计数,共计5个视野,取其平均值。结果判断按Shimizu方法,对每张切片阳性细胞的阳性强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别打0、1、2、3分,着色阳性面积按无着色、着色<1/3、1/3~2/3、>2/3分别打0、1、2、3分,然后根据两项打分之之和判断其结果:0~2分为阴性(-),≥3分为阳性,其中3分为(+),4分为(++),5分及以上者为(+++)。

1.4 统计学处理 MMP-13与临床病理指标关系的比较,采用行×列表进行 $\chi^2$ 检验,生存曲线的比较采用Kaplan-Meier法。 $P=0.05$ 为显著检验水准。均在计算机上由SPSS 13.0统计软件进行。

## 2 结果

2.1 乳腺癌组织和对照组MMP-13的表达 在乳腺癌组织中MMP-13的阳性表达率为54.1%(99/183)。如图1所示,阳性表达主要定位于肿瘤细胞膜和细胞质,且阳性物质主要分布于肿瘤细胞,少数分布于肿瘤间质,而间质中主要是巨噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞和和胶原纤维着色。对照组有4例呈弱阳性表达(+),其余均为阴性,阳性表达率13.3%。乳腺癌组与良性对照组MMP-13的表达具有显著性差异( $P<0.01$ )。

2.2 乳腺癌组织中MMP-13表达与临床病理因素之间的关系 由表1可以看出乳腺癌中MMP-13的表达与临床TNM分期、淋巴结转移状态、组织学分级密切相关( $P$ 均<0.01);而与肿瘤大小、年龄、月经状态、病理类型以及雌孕激素受体状态无关。

2.3 MMP-13不同表达水平对乳腺癌患者术后生存的影响 经Kaplan-Meier生存分析,MMP-13低表达组(-~+)10年生存率与高表达组比较有明显差异( $P<0.01$ ),见图2。

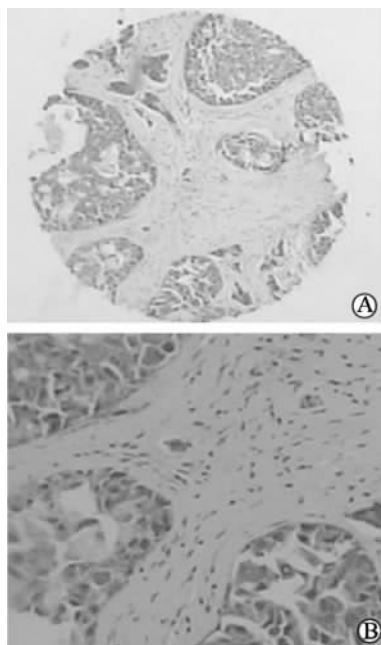


图1 乳腺癌组织中MMP-13的表达

Fig 1 Expression of MMP-13 in breast cancer tissues

A: Cancer cells are brown, indicating strong expression of MMP-13 (SP, ×100); B: The brown positive particles are seen in plasma and membrane of cancer cells, indicating strong expression of MMP-13 (SP, ×400)

## 3 讨论

MMPs是细胞外基质降解过程中必不可少的酶,几乎能降解细胞外基质的所有成分。目前至少发现了28个家族成员。根据作用底物及结构的不同,MMPs通常分为4类:胶原酶,明胶酶,基质溶解素,膜型MMPs。胶原酶:包括间质胶原酶(MMP-1)、粒细胞胶原酶(MMP-8)和胶原酶3(MMP-13),可裂解I、II、III型胶原蛋白。明胶酶:降解明胶和IV、V、VII、IX和X型胶原。基质溶解素:包括基质溶解素1(MMP-3)、基质溶解素2(MMP-10)、基质溶解素3(MMP-11)和基质溶解素(MMP-7)。基质溶解素作用底物广泛,可降解基底膜中的多种成分。膜型MMPs:目前发现5个成员,可参与MMPs其他成员的激活和信号传递。目前乳腺癌相关研究多集中于MMP-1、2、3、9、11、13、19,如:MMP-1与硬癌关系密切<sup>[1]</sup>,MMP-2和MMP-9与淋巴结转移以及血管形成有关,MMP-11被认为是高度浸润性肿瘤和原发乳癌分期较晚的标志,MMP-2被认为是乳癌低生存率的独立预后因素<sup>[2]</sup>。

表 1 乳腺癌中 MMP-13 表达与临床病理因素之间的关系

Tab 1 Relationship between MMP-13 expression and clinicopathological parameters of breast cancer

Index	N	MMP-13(n)				Positive rate(%)	P
		-	+	++	+++		
Age(t/year)							
≤45	76	35	10	15	16	53.9	0.858
>45	107	49	10	23	25	54.2	
Menses status							
Pre-menopause	97	46	11	20	20	52.6	0.934
Post-menopause	86	38	9	18	21	55.8	
Tumor size(d/cm)							
≤2	13	6	2	3	2	53.8	0.190
2-5	109	56	13	22	18	48.6	
>5	61	22	5	13	21	63.9	
TNM stage							
I	22	16	3	2	1	27.3	0.000
II	93	64	14	17	1	31.2	
III	68	7	3	19	39	89.7	
Pathological type							
IDC	124	58	13	23	30	53.2	0.630
ILC	28	10	5	7	6	64.3	
Others	31	16	2	8	5	48.4	
Histological grade							
I	67	44	7	6	10	34.3	0.000
II	57	23	9	15	10	59.6	
III	59	17	4	17	21	71.2	
Lymph node status							
Negative	86	53	11	16	6	38.4	0.000
Positive	97	31	9	22	35	68.0	
ER							
Negative	73	33	8	19	13	54.8	0.427
Positive	110	51	12	19	28	53.6	
PR							
Negative	107	50	12	21	24	53.3	0.975
Positive	76	34	8	17	17	55.3	

IDC; Invasive ductal carcinoma; ILC; Invasive lobular carcinoma; ER; Estrogen receptor; PR; Progesterone receptor

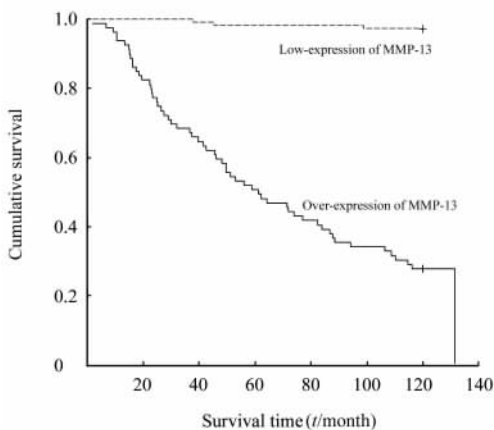


图 2 MMP-13 高表达组和低表达组乳腺癌患者术后 10 年生存曲线

Tab 2 Ten year survival curves of MMP-13 over-expression and low-expression groups

MMP-13 作为基质金属蛋白酶家族的一员,主要降解 I、II、III、IV、X 型胶原纤维以及粘蛋白、纤维连接蛋白、蛋白多糖和原纤维蛋白。MMP-13 可以被多种 MMPs 激活,包括 MMP-2/MMP-3 和 MT1-MMP<sup>[3-4]</sup>,还可被多种细胞因子和生长因子激活如 TNF-α 和 TGF-β<sup>[4-5]</sup>。MMP-13 在多种恶性肿瘤中表达,如乳腺癌、结肠癌、皮肤癌、基底细胞癌并且与肿瘤的生物行为学和预后有关<sup>[6-13]</sup>。研究表明,MMP-13 在良性病变和癌前病变中几乎不表达<sup>[14]</sup>,但可明显增强恶性肿瘤细胞的浸润能力<sup>[15]</sup>。

本研究结果表明,在乳腺癌组织中 MMP-13 的阳性表达率为 54.1% (99/183)。乳腺癌组织中 MMP-13 呈棕黄色颗粒,定位于肿瘤细胞膜和细胞质。且阳性物质主要分布于肿瘤细胞,少数分布于

肿瘤间质,而间质中主要是巨噬细胞、成纤维细胞、血管内皮细胞和胶原纤维着色。阳性物质的分布呈灶性,在肿瘤边缘浸润区着色最强。提示乳腺癌组织可能具有较强的分泌 MMP-13 的能力。由于肿瘤细胞的异质性,MMP-13 在肿瘤组织中的表达也呈现不均一性。本研究中 MMP-13 多表达于肿瘤细胞浸润的前沿,这与瘤细胞侵袭的生物学特性符合。乳腺癌中 MMP-13 的表达与临床 TNM 分期、淋巴结转移状态、组织学分级密切相关( $P$  均 $<0.01$ );而与肿瘤大小、年龄、月经状态、病理类型以及雌孕激素受体状态无关。说明 MMP-13 与乳腺癌的浸润和转移关系密切,在 TNM 分期较晚,组织学分级高,有腋淋巴结转移的病例,MMP-13 呈高表达。MMP-13 低表达组(-~+)10 年生存率为 98.4%,而高表达组(++~+++)10 年生存率为 68.3%,两组比较有明显差异( $P<0.01$ ),经生存分析我们认为,MMP-13 可作为乳腺癌患者预后判断的指标。

本研究采用组织芯片的方法对大样本进行 MMP-13 在蛋白水平的检测,并结合完整 10 年随访资料进行预后分析,有一定的参考价值,但其与肿瘤的确切关系及作用机制仍有待进一步的研究探讨。

#### [参考文献]

- [1] Iwata H, Kobayashi S, Masaoka A, et al. Production of matrix metalloproteinase and tissue inhibitors in human breast carcinomas[J]. Jpn J Cancer Res, 1996, 87:602-611.
- [2] Talvensaaari-Mattila A, Paakko P, Hoyhtya M, et al. Matrix metalloproteinase-2 immunoreactive protein: a marker of aggressive in breast carcinoma[J]. Cancer, 1998, 83: 1153-1162.
- [3] Leeman M F, McKay J A, Murray G I, et al. Matrix metalloproteinase 13 activity is associated with poor prognosis in colorectal cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55:758-762.
- [4] Thomas G T, Lewis M P, Speight P M, et al. Matrix metalloproteinases and oral cancer[J]. Oral Oncol, 1999, 35:227-233.
- [5] Ala-Aho R, Johansson N, Baker A H, et al. Expression of col-

lagenase-3 (MMP-13) enhances invasion of human fibrosarcoma HT-1080 cells[J]. Int J Cancer, 2002, 97:283-289.

- [6] Nakopoulou L, Giannopoulou I, Gakiopoulou H, et al. Matrix metalloproteinase-1 and -3 in breast cancer: correlation with progesterone receptors and other clinicopathologic features[J]. Hum Pathol, 1999, 30:436-442.
- [7] Pendas A M, Uria J A, Jimenez M G, et al. An overview of collagenase-3 expression in malignant tumors and analysis of its potential value as a target in antitumor therapies[J]. Clin Chim Acta, 2000, 291:137-155.
- [8] Nielsen B S, Rank F, Lopez J M, et al. Collagenase-3 expression in breast myofibroblasts as a molecular marker of transition of ductal carcinoma *in situ* lesions to invasive ductal carcinomas[J]. Cancer Res, 2001, 61:7091-7100.
- [9] Toriseva M J, Ala-aho R, Karvinen J, et al. Collagenase-3 (MMP-13) enhances remodeling of three-dimensional collagen and promotes survival of human skin fibroblasts[J]. J Invest Dermatol, 2007, 127:49-59.
- [10] Tardif G, Reboul P, Pelletier J P, et al. Ten years in the life of an enzyme: the story of the human MMP-13 (collagenase-3) [J]. Mod Rheumatol, 2004, 14:197-204.
- [11] Hsu P, Shen G H, Ko J L, et al. Matrix metalloproteinase-13 expression is associated with bone marrow microinvolvement and prognosis in non-small cell lung cancer[J]. Lung Cancer, 2006, 52:349-357.
- [12] Luukka M, Vihinen P, Kronqvist P, et al. Association between high collagenase-3 expression levels and poor prognosis in patients with head and neck cancer[J]. Head Neck, 2006, 28:225-234.
- [13] Curran S, Dundas S R, Buxton J, et al. Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10:8229-8234.
- [14] Morgia G, Falsaperla M, Malaponte G, et al. Matrix metalloproteinases as diagnostic (MMP-13) and prognostic (MMP-2, MMP-9) markers of prostate cancer[J]. Urol Res, 2005, 33:44-50.
- [15] Elnemr A, Yonemura Y, Bandou E, et al. Expression of collagenase-3 (matrix metalloproteinase-13) in human gastric cancer [J]. Gastric Cancer, 2003, 6:30-38.

[收稿日期] 2007-01-11

[修回日期] 2007-04-08

[本文编辑] 孙岩

## 欢迎订阅

《第二军医大学学报》

ISSN 0258-879X  
CN 31-1001/R

JOURNAL OF MEDICAL COLLEGES OF PLA ISSN 1000-1948  
CN 31-1002/R

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-373

上海市翔殷路 800 号(邮编:200433) 邮发代号:4-725