

EB 病毒感染与基质金属蛋白酶-7 在胃癌发生中的作用

王美兰¹, 柳 丽² (1. 山东省莱阳卫生学校 265200; 2. 山东省莱阳中医医院 265200)

【摘要】 目的 探讨 EB 病毒 (EBV) 感染、基质金属蛋白酶-7 (MMP-7) 在胃癌发生和发展中的相互作用。**方法** 采用原位核酸杂交技术检测 304 例胃癌和相应癌旁组织中 EBV 小 RNA (EBER1) 的表达, 确证 EBV 相关胃癌 (EBVaGC)。采用免疫组化技术检测 20 例 EBVaGC、46 例临床指标与之匹配的 EBV 阴性胃癌 (EBVnGC) 以及 66 例相应癌旁组织 MMP-7 的表达, 结合患者临床病理资料进行综合分析。**结果** (1) 胃癌组织 EBV 阳性率为 6.58%, 显著高于相应癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) EBVaGC 和 EBVnGC 中 MMP-7 的阳性率分别为 65.00% 和 60.87%, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** EBV 感染与部分胃癌的发生相关, 但未观察到 EBV 感染对胃癌组织中 MMP-7 表达的影响。

【关键词】 EB 病毒; 胃癌; 原位杂交; 免疫组织化学技术; 基质金属蛋白酶

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2011.21.019 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2011)21-2596-02

Effect of MMP-7 with EBV in gastric carcinoma WANG Mei-lan¹, LIU Li² (1. Laiyang Health School, Shandong 265200, China; 2. Laiyang Traditional Chinese Medicine Hospital, Shandong 265200, China)

【Abstract】 Objective To detect the effect of MMP-7 with epstein-barr virus (EBV) in the gastric carcinoma (GC). **Methods** EBV-encoded small RNA1 (EBER1) was detected by in situ hybridization (ISH) in 304 GC and corresponding para-carcinoma tissues. The expression of MMP-7 in 20 EBVaGC, 46 EBV-negative gastric carcinomas (EBVnGC) tissues and 66 corresponding para-carcinoma tissues were detected by immunohistochemistry. **Results** (1) The positive rate of EBV (6.58%) in GC tissues was higher than that in the corresponding para-carcinoma tissues. There was statistical significance ($P < 0.05$). (2) The positive rate of MMP-7 in EBVaGC was 65.00% and 60.87% in EBVnGC. There was no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** EBV infection is related with some GC, but its influence on the expression of MMP-7 was not observed.

【Key words】 epstein-barr virus; gastric carcinomas; in situ hybridization; immunohistochemistry; matrix metalloproteinases

EB 病毒 (EBV) 属疱疹病毒科 γ 亚科成员, 是致癌病毒之一。研究发现约 2%~16% 的胃癌组织 EBV 阳性, 且可见于各种病理类型的胃癌, 如高分化腺癌、中分化腺癌、低分化腺癌和印戒细胞癌等。侵袭转移是恶性肿瘤的重要特点, 许多研究提示, 肿瘤侵袭转移的能力与其产生或诱导产生基质金属蛋白酶 (MMPs) 的能力密切相关。MMP-7 属于 MMP 基因家族中的成员之一, 其相对分子质量最小, 为 28×10^3 , 由于它缺乏 C 末端区域, 在胃癌的发生和发展中可能起着比其他 MMP 家族成员更为重要的作用。本研究应用核酸原位杂交技术 (ISH) 检测 304 例胃癌组织和相应癌旁组织 EBV 小 RNA (EBER1) 的表达, 以确证 EBV 感染, 应用免疫组化技术检测 EBV 相关胃癌 (EBVaGC)、临床指标与之匹配的 EBV 阴性胃癌 (EBVnGC) 以及相应癌旁组织中 MMP-7 的表达情况, 结合临床病理资料进行综合分析, 探讨 EBV 感染在胃癌浸润转移中的作用, 以期阐明 EBVaGC 的发生机制及其防治提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 标本来源 收集青岛大学医学院附属医院和莱阳中心医院病理科存档的胃癌和相应癌旁组织 (距离癌组织 5 cm 以上) 石蜡标本各 304 例, 男 223 例, 女 81 例; 年龄 34~80 岁; ≥ 60 岁 159 例, < 60 岁 145 例。全部标本均经 4% 甲醛液固定、脱水石蜡包埋, 用以制备组织切片进行病理学分析、ISH 和免疫组化技术检测。

1.2 ISH 检测 EBER1 应用 ISH 检测 304 例胃癌组织及相应癌旁组织中 EBER1 的表达情况。石蜡切片常规脱蜡至水,

蛋白酶 K 37℃ 消化 15~20 min, 0.1% 甘氨酸溶液轻洗约 30 s, 终止消化反应。标准柠檬酸盐水 (SSC) 轻洗 1 次后加地高辛标记的 EBER1 寡核苷酸探针盖玻片覆盖, 37℃ 杂交反应过夜。2×SSC 洗片后加碱性磷酸酶标记的抗地高辛抗体, 37℃ 反应 1 h。Buffer 1# 振荡洗片 15 min×2 次。Buffer 3# 振荡洗片 2 min。加显色液置湿盒中 37℃ 反应 3 h, 2×SSC 洗片 10~30 s。Buffer 4# (0.01 mol Tris-HCl, 1 mmol 乙二胺四乙酸, pH8.0) 洗片 3 min×3 次。0.5% 甲基绿复染 5~20 min, 显微镜下观察结果。

1.3 免疫组化检测 MMP-7 的表达 应用免疫组化 EliVision TM super 法检测 66 例胃癌组织及相应癌旁组织中 MMP-7 的表达情况。石蜡切片常规脱蜡至水, 3% 过氧化氢消除内源性过氧化物酶活性, 0.01 M/L 柠檬酸盐缓冲液微波修复抗原 8 min×2 次, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗片后滴加 1:100 稀释的鼠抗人 MMP-7 抗体 4℃ 过夜。过氧化物酶标记的链霉卵白素染色后常规二氨基联苯胺溶液显色, 苏木素复染, 封片后观察结果。PBS 代替一抗设为阴性对照, 已知 MMP-7 阳性的乳腺癌组织标本作为阳性对照。

1.4 结果判断 细胞核染深蓝色者为 EBER1 阳性。癌细胞胞浆内出现棕黄色颗粒为 MMP-7 阳性, 光镜下用高倍镜视野对每例组织切片癌组织区域连续计数 500 个癌细胞, 计算阳性细胞数所占的比例。其中无细胞染色为 (-), 阳性细胞所占比例小于 10% 为 (+), 阳性细胞数占 10%~50% 为阳性 (++) , 阳性细胞数大于 50% 为强阳性 (+++)。为便于统

计描述,对样本进行如下分类,(−)定为阴性,(+),(++)、(+++)定为阳性表达。

1.5 统计学方法 采用 CS2000 统计软件包,计数资料用四格表 χ^2 检验及精确概率法,检验水准 $P=0.05$ 。

2 结 果

2.1 胃癌组织和相应癌旁组织中 EBER1 的检测 EBER1 阳性信号为细胞核浓染且呈深蓝色,对阳性标本的组织切片用 Sense 探针进行检测证实杂交反应的特异性,并进行 HE 染色,结合患者临床病理资料进行综合分析。304 例标本中有 20 例胃癌组织癌细胞检测到 EBER1 阳性信号(6.58%),而相应癌旁组织均未检测到 EBER1 阳性信号,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 1。

表 1 胃癌组织和相应癌旁组织 EBV 阳性结果

胃癌组织	癌旁组织		合计
	EBV 阳性	EBV 阴性	
EBV 阳性	0	20	20
EBV 阴性	0	284	284
合计	0	304	304

注: $\chi^2=18.050$ 。

2.2 EBVaGC 和 EBVnGC 中 MMP-7 的表达 见表 2。EBVaGC 和 EBVnGC 中 MMP-7 的阳性率分别是 65.00%(13/20)和 60.87%(28/46)。差异无统计学意义($P>0.05$)。免疫组化检测 MMP-7 在胃癌和癌旁组织中的阳性表达为胞膜/胞浆内呈现棕黄色颗粒。

表 2 EBVaGC 和 EBVnGC 组织中 MMP-7 表达的比较

胃癌组织	n	MMP-7	
		阳性	阴性
EBVaGC	20	13	7
EBVnGC	46	28	18

注: $\chi^2=0.101$ 。

3 讨 论

EBV 是传染性单核细胞增多症的病原体,并与多种淋巴系统恶性肿瘤的发生密切相关。世界范围的研究表明,胃癌中 EBV 阳性率为 2%~16%不等,1993 年 Tokunaga 等^[1]将 ISH 检测 EBER 证实胃癌细胞 EBER 阳性者定义为 EBVaGC。

本实验结果表明,304 例胃癌组织中检测到 20 例 EBER1 阳性,EBVaGC 阳性率为 6.58%,而相应癌旁组织均为阴性,胃癌组织 EBV 阳性率明显高于相应癌旁组织,提示 EBV 感染与胃癌发生有一定关系^[2]。原位杂交显示 EBVaGCs 阳性杂交信号均来自癌细胞,而不是血液中淋巴细胞或癌组织中浸润的淋巴细胞,而且几乎所有癌细胞观察到 EBER1 阳性信号,提示 EBV 感染发生在胃癌形成的早期,感染 EBV 的肿瘤细胞单克隆增生,从而导致 EBVaGC 组织中几乎所有癌细胞均为 EBV 阳性^[3-4]。

侵袭转移是恶性肿瘤的重要特点,在肿瘤侵袭转移过程中,细胞外基质(ECM)的降解是一个极重要的步骤,肿瘤细胞

只有通过降解 ECM 并使自身穿过 ECM 侵入血管及从血管移出,才能到达宿主器官。许多研究提示,肿瘤侵袭转移的能力与其产生或诱导产生 MMPs 的能力密切相关。MMP-7 属于基质溶解素,由于缺乏与血红素结构蛋白同源序列而成为金属蛋白酶家族的最小成员,其相对分子质量为 28×10^3 。MMP-7 具有强大的基质降解活性和广泛的底物特异性,包括Ⅳ型胶原、层黏蛋白、纤维结合素、蛋白多糖、Ⅰ型明胶和可溶性弹性蛋白等底物,同时受基质金属蛋白酶组织抑制剂的负性调节较小,这也是在胃癌组织中 MMP-7 比其他 MMP 家族成员起更为重要作用的分子基础。研究表明,MMP-7 既能提高肿瘤细胞的增殖活性,增强其侵袭能力,又能提高内皮细胞的增殖活性,促进肿瘤的血管和淋巴管生成,为肿瘤细胞转移提供门户^[5-6]。在肿瘤的侵袭和转移过程中,MMP-7 起促进作用^[7-8]。

本实验结果显示,EBVaGC 和 EBVnGC 组织中 MMP-7 的表达率无显著性差异,提示 EBV 感染对 MMP-7 的表达可能影响不大,并未促进胃癌的转移及其恶化,也可能与样本数量较少有关。因此,还有必要对该地区胃癌患者进行大样本和进一步观察研究。

参考文献

[1] Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, et al. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma[J]. Am J Pathol, 1993, 143(5): 1250-1254.

[2] 陈维忠, 胡晓峰, 孙淑红. EBV 感染与胃癌的相关性分析[J]. 医学检验与临床, 2008, 19(1): 34-35.

[3] Shibata D, Tokunaga M, Uemura Y, et al. Association of Epstein-Barr virus with undifferentiated gastric carcinomas with intense lymphoid infiltration[J]. Am J Pathol, 1991, 139(3): 469-474.

[4] Pittaluga S, Loke SL, So KC, et al. Clonal Epstein-Barr virus in lymphoepithelioma-like carcinoma of the stomach: demonstration of viral genome by in situ hybridization and Southern blot analysis[J]. Mod Pathol, 1992, 5(6): 661-664.

[5] Liu XP, Oga A, Suehiro Y, et al. Inverse relationship between matrilysin expression and proliferative activity of cells in advanced gastric carcinoma[J]. Hum Pathol, 2002, 33(7): 741-747.

[6] Nishizuka I, Ichikawa Y, Ishikawa T, et al. Matrilysin stimulates DNA synthesis of cultured vascular endothelial cells and induces angiogenesis in vivo[J]. Cancer Lett, 2001, 173(2): 175-182.

[7] 杨晓文, 王世清, 莫平. MMP-7 和 TIMP-2 表达在遗传性非息肉变性大肠癌侵袭转移中的作用[J]. 重庆医学, 2009, 38(7): 817-818.

[8] 周德娟, 马致南. MMP-7 在卵巢癌组织中的表达及临床意义[J]. 黑龙江医药科学, 2007, 30(2): 15-16.