

· 论 著 ·

基质金属蛋白酶-9 和血管内皮生长因子的表达与肺癌血管生成的相关性及其意义

阳 俊, 李 泽[△]

(湖北医药学院附属襄阳市第一人民医院呼吸内科, 湖北襄阳 441000)

摘要:目的 探讨肺癌组织中基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达与肺癌血管生成的相关性及其意义。**方法** 选取该院 60 例手术治疗的肺癌患者,应用免疫组织化学法检测正常肺组织和肿瘤组织的 MMP-9、VEGF 表达与微血管密度(MVD),分析 MMP-9、VEGF 表达与 MVD 及临床病理资料的相关性。**结果** (1)癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达的阳性率分别为 66.67%和 63.33%,高于正常组织的 10.00%和 13.33% ($\chi^2_{MMP-9} = 69.854, \chi^2_{VEGF} = 52.382, P < 0.05$)。 (2)癌组织 MMP-9 积分越高,VEGF 光密度越高,MMP-9 积分与 VEGF 表达呈正相关性 ($r = 0.569, P < 0.05$)。 (3)癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性患者 MVD 显著高于阴性患者 ($t_{MMP-9} = 32.654, t_{VEGF} = 28.446, P < 0.05$)。 (4)MMP-9 与 VEGF 均阳性、单纯 MMP-9 阳性、单纯 VEGF 阳性、MMP-9 与 VEGF 均阴性患者 3 年复发率分别为 65.00%、56.25%、53.85%、36.36%,病死率分别为 40.00%、25.00%、30.77%、18.18%,差异有统计学意义 ($\chi^2_{复发} = 56.372, \chi^2_{病死} = 36.752, P < 0.05$)。**结论** 肺癌组织中 MMP-9 和 VEGF 表达阳性对肺癌血管生成有一定影响,且该类患者术后 3 年的复发率和病死率较高。

关键词:基质金属蛋白酶-9; 血管内皮生长因子; 微血管密度

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2017.14.026 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-9455(2017)14-2075-03

Expression of MMP-9 and VEGF in lung cancer and the relationship between angiogenesis of lung cancer and its significance

YANG Jun, LI Ze[△]

(Department of Respiratory Medicine, Xiangyang City First People Hospital Affiliated Hubei University of Medicine, Xiangyang, Hebei 441000, China)

Abstract: **Objective** To explore the expression of matrix metalloproteinases-9(MMP-9) and vascular endothelial growth factor(VEGF) in lung cancer and the relationship between angiogenesis of lung cancer and its significance. **Methods** 60 cases with lung cancer treated with surgery were selected, expression of MMP-9, VEGF and microvessel density(MVD) in normal lung tissue and tumor tissues were detected by immunohistochemistry, analysis of the relationship between MMP-9, VEGF expression and MVD and clinical pathological data. **Results** (1)The positive rates of MMP-9 and VEGF expression in cancer tissues were 66.67% and 63.33%, which were higher than 10.00% and 13.33% in normal tissues ($\chi^2_{MMP-9} = 69.854, \chi^2_{VEGF} = 52.382, P < 0.05$). (2)The higher the MMP-9 score, the higher the VEGF density, the positive correlation between MMP-9 score and VEGF expression ($r = 0.569, P < 0.05$). (3)The positive expression of MMP-9 and VEGF in cancer tissues were significantly higher than those in negative patients ($t_{MMP-9} = 32.654, t_{VEGF} = 28.446, P < 0.05$). (4)MMP-9 and VEGF were positive, only MMP-9 positive, only VEGF-positive, MMP-9 and VEGF-negative patients three-year recurrence rate were 65%, 56.25%, 53.85% and 36.36%, respectively, and the mortality rates were 40.00%, 25.00%, 30.77% and 18.18% respectively. The difference was statistically significant ($\chi^2_{recurrence} = 56.372, \chi^2_{mortality} = 36.752, P < 0.05$). **Conclusion** The positive expression of MMP-9 and VEGF in lung cancer have certain effects on the angiogenesis of lung cancer, the three year recurrence rate and mortality rate are higher after operation.

Key words: lung cancer matrix metalloproteinase-9; vascular endothelial growth factor; microvessel density

肺癌是我国高发的呼吸系统恶性肿瘤,严重威胁人们的健康^[1]。尽管随医疗水平的进步,肺癌患者术后生存期限有所延长,但 3 年复发率仍处于较高水平。近年来,国内外研究发现新生血管的形成是恶性肿瘤复发的独立危险因素,基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达对恶性肿瘤患者的复发、转移具有重要影响,对患者预后具有一定的临床价值^[2-3]。现检测肺癌组织中 MMP-9 和 VEGF 的表达,分析其对肺癌血管生成的影响及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2013 年 1—12 月该院胸外科手术治疗的肺癌患者 60 例,男 38 例,女 22 例,年龄 44~70 岁,平均年龄(58.75±11.25)岁,<60 岁者 33 例(55.00%),≥60 岁者 27 例(45.00%),临床分期:Ⅱ期 40 例,Ⅲ期 20 例;T 分期:T2 期

22 例,T3 期 38 例;N 分期:N0 期 37 例,N1 期 23 例。病理检查:鳞癌 31 例,腺癌 22 例,小细胞癌 7 例;低分化 22 例,中分化 18 例,高分化 10 例。

1.2 纳入与排除标准 (1)纳入标准:①手术治疗病理学证实为肺癌。②术前均行影像学检查,临床分期及 T、N 分期明确。③病理组织免疫组织化学染色效果良好。④术后随访规律,定期接受影像学检查。⑤患者遵医行为良好,按期复查。(2)排除标准:①病理组织合并慢性炎性、瘢痕、囊性变等组织成分。②中途失访者。③其他原因导致病死者。

1.3 标本采集 术后 30 min 至 1 h 内冰上收集每例患者的离体标本,冰上收集癌组织与距离癌灶 5 cm 以外的正常肺组织各 1 份。固定于多聚甲醛溶液(40 g/L)中,用于免疫组织化学染色。其中癌组织无明显坏死区,病理学检查富含癌实质成

分。正常癌旁组织距癌组织病理学检查为分化良好的肺组织。

1.4 免疫组织化学分析 癌组织与正常组织甲醛溶液固定 12 h 后取材,用自来水冲洗,采用链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(S-P)免疫组织化学染色法检测 MMP-9、VEGF 表达与血管密度(MVD):(1)将标本进行脱水、透明、渗透处理,然后石蜡包埋,以 3 μm 厚度进行连续切片,取 3 张保存待检。(2)进行免疫组织化学染色。具体步骤包括烤片、脱蜡、应用梯度酒精法脱水、PBS 洗片、微波抗原修复,然后按照 S-P 染色法滴加 MMP-9、VEGF 等试剂染色,再用蒸馏水冲洗、梯度酒精脱水、二甲苯固定。(3)晾干切片,应用中性树胶封片,显微镜下观察结果。免疫组织化学试剂盒均由上海拜力生物科技有限公司提供,操作步骤严格按试剂盒说明书进行。MVD 检测时应用 CD34 标记血管内皮细胞。

1.5 MMP-9、VEGF 表达与 MVD 判定标准 均采用 Image-proplus 6.0 专业图像分析软件进行分析。

1.5.1 MMP-9 判定^[4] 根据细胞染色强度进行评分:0 分表示不着色;1 分表示黄色;2 分表示棕黄色;3 分表示黄褐色。每个视野观察 100 个细胞:阳性细胞数小于 5% 为 0 分;5%~25% 为 1 分;26%~50% 为 2 分;51%~75% 为 3 分;>75% 为 4 分。染色强度与阳性细胞百分比得分乘积大于 2 分为阳性。

1.5.2 VEGF 判定^[5] 细胞染色呈浅黄色至棕黄色颗粒为 VEGF 阳性,显色强度与背景无显著差异为 VEGF 阴性细胞,每个视野观察 100 个细胞:阳性细胞计数大于或等于 30% 为阳性,阳性细胞计数小于 30% 为阴性。并采用 Image-proplus 6.0 专业图像分析软件分析 5 个阳性视野的光密度值,取其平均值。

1.5.3 MVD 判定^[6] 首先选用 40 倍的光学显微镜寻找血管密度较高的区域,然后换用 200 倍光学显微镜在该区域随机选择 5 个视野,计数微血管数量,取平均值。以本研究 MVD 均值作为微血管密度高低判定的界值,癌旁正常组织选择阳性血管最丰富的区域观察,计数方法同上。

1.6 随访与观察指标 所有患者术后每 3 个月门诊或电话随访 1 次,连续随访 3 年,病死患者终止随访,以影像学检查发现新肿块或转移灶确定为复发。观察指标:(1)癌组织和正常组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性率。(2)癌组织 MMP-9 积分与 VEGF 表达的相关性。(3)比较癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性与阴性患者 MVD。(4)比较不同 MMP-9 和 VEGF 表达患者 3 年复发率及病死率。

1.7 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较使用 t 检验;计数资料以例数或百分率表示,应用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 癌组织和正常组织 MMP-9 表达阳性率结果比较 癌组织 MMP-9 表达阳性率高于正常组织,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 69.854, P < 0.05$)。见表 1。

表 1 癌组织和正常组织 MMP-9 表达阳性率结果比较

类别	阳性例数(n)	阴性例数(n)	阳性率(%)
癌组织	40	20	66.67
正常组织	6	54	10.00

2.2 癌组织和正常组织 VEGF 表达阳性率结果比较 癌组织 VEGF 表达阳性率高于正常组织,差异有统计学意义 ($\chi^2 = 52.382, P < 0.05$)。见表 2。

表 2 癌组织和正常组织 VEGF 表达阳性率比较

类别	阳性例数(n)	阴性例数(n)	阳性率(%)
癌组织	38	22	63.333
正常组织	8	52	13.333

2.3 癌组织 MMP-9 积分与 VEGF 表达的相关性 癌组织 MMP-9 积分越高,VEGF 光密度越高,MMP-9 积分与 VEGF 表达呈正相关性($r = 0.569, P < 0.05$)。见图 1。

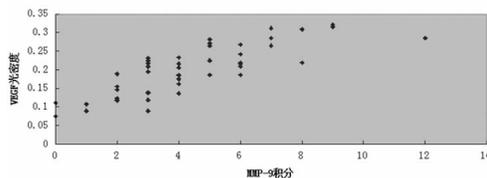


图 1 MMP-9 积分与 VEGF 表达相关性

2.4 癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性与阴性患者 MVD 结果比较 癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性患者 MVD 显著高于阴性患者,差异有统计学意义 ($t_{MMP-9} = 32.654, t_{VEGF} = 28.446, P < 0.05$)。见表 3。

表 3 癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性与阴性患者

MVD 结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

检测指标	类别	例数(n)	MVD	t	P
MMP-9	阳性	40	23.83 ± 5.77	32.654	0.000
	阴性	20	17.05 ± 2.42		
VEGF	阳性	38	22.89 ± 5.65	28.446	0.000
	阴性	22	17.38 ± 2.09		

2.5 不同 MMP-9 和 VEGF 表达患者 3 年复发率及病死率结果比较 MMP-9 与 VEGF 均阳性、单纯 MMP-9 阳性、单纯 VEGF 阳性、MMP-9 与 VEGF 均阴性患者 3 年复发率分别为 65.00%、56.25%、53.85%、36.36%,病死率分别为 40.00%、25.00%、30.77%、18.18%,差异有统计学意义 ($\chi^2_{复发} = 56.372, \chi^2_{病死} = 36.752, P < 0.05$)。见表 4。

表 4 不同 MMP-9 和 VEGF 表达患者 3 年复发率及病死率比较 [n(%)]

类型	例数(n)	复发率	病死率
MMP-9(+)	16	9(56.25)	4(25.00)
VEGF(+)	13	7(53.85)	4(30.77)
MMP-9(+)/VEGF(+)	20	13(65.00)	8(40.00)
MMP-9(-)/VEGF(-)	11	4(36.36)	2(18.18)
χ^2		56.372	36.752
P		0.000	0.000

3 讨 论

国内外大量研究报道均显示,肺癌是目前全球范围内发病率最高的恶性肿瘤,对人们的健康构成严重威胁。随着医学技术的快速发展,手术切除肺内肿瘤技术已非常成熟^[1,7-8],但术后复发、转移率仍处于较高水平。目前针对肺癌术后复发及转移的诊断主要通过影像学检查,但影像学一旦检出,往往丧失最佳治疗时间窗,治疗效果通常不理想。因此探讨一种预测指标,具有重要的临床价值。

近年来国内外研究发现,恶性肿瘤组织的生长、转移及分化等均依赖血管生成,促血管生成因子在肿瘤进展中发挥了重要作用^[1,9],Aresu 等^[10] 研究报道 MMP-9 在肿瘤复发、侵袭及转移中的作用,除了降解细胞外基质,还可促进恶性肿瘤血管

生成。正常情况下,除代谢旺盛与血供丰富的组织,如胚胎组织、增殖期子宫内膜,以及血管内皮细胞中 VEGF 表达呈高水平,其他组织 VEGF 表达较低,但恶性肿瘤细胞通常增生活跃、代谢相对旺盛,VEGF 表达水平较高,且其表达程度与肿瘤恶性程度具有正相关性^[11]。两者对恶性肿瘤复发、转移具有一定的促进作用($P < 0.05$)。本研究数据显示,肺癌肿瘤组织 MMP-9 与 VEGF 表达阳性率显著高于正常组织, MMP-9 与 VEGF 表达阳性的患者 MVD 显著高于阴性患者,且两者相关性分析证实具有正相关性,与国内外学者研究数据基本一致,提示 MMP-9 与 VEGF 对肺癌的发生、发展具有一定影响,且在肿瘤血管生成中可能发挥一定作用。

本研究表明,癌组织 MMP-9 和 VEGF 表达阳性对预后的影响, MMP-9 和 VEGF 均表达阳性的患者术后 3 年内复发率与病死率最高,单纯 MMP-9 或 VEGF 表达阳性者其次,两者表达均阴性者最低,提示两者是肺癌术后复发、转移发生的危险因素。Stapley 等^[12] 研究报道食管癌患者肿瘤组织 VEGF 表达阳性患者,淋巴结转移发生率较高,两者具有相关性,VEGF 不仅可促进肿瘤血管生长,同时对淋巴管的形成也有一定促进作用,两者均对肿瘤复发构成影响。顾咸庆等^[13] 研究显示,VEGF 在非小细胞肺癌组织中呈高表达,有助于肿瘤血管、淋巴管的生成,是术后复发及淋巴结转移的独立危险因素。还有研究报道, MMP-9 能降解细胞外基质中的 IV、V 型胶原及明胶,促进恶性肿瘤细胞的侵袭转移。同时在降解 ECM 的同时, MMP-9 还参与血管内皮细胞穿透基底膜,逐步形成毛细血管出芽的过程,可为新生血管的生长提供空间,加速肿瘤扩散^[14-15]。

综上所述,肺癌组织中 MMP-9 和 VEGF 表达阳性率较高,高表达对肺癌血管生成具有一定促进作用,对术后复发及病死率具有一定影响,两者可作为评估术后预后效果的客观指标。

参考文献

[1] 钱海红. 非小细胞肺癌化疗前后血清 VEGF 和 MMP-9 水平的对照观察[J]. 河北医药, 2013, 35(4): 496-497.
 [2] Feng Y, Hu J, Ma J, et al. RNAi-mediated silencing of VEGF-C inhibits non-small cell lung cancer progression by simultaneously down-regulating the CXCR4, CCR7, VEGFR-2 and VEGFR-3-dependent axes-induced ERK, p38 and AKT signalling pathways[J]. Eur J Cancer, 2011, 47(15): 2353-2363.
 [3] Wang C, Ma HX, Jin MS, et al. Association of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and-9 expression with extra-gastrointestinal stromal tumor metastasis[J]. Asian Pacific J Cancer Prevent, 2014, 15(10): 4187-4192.

[4] Fanelli MF, Chinen LT, Begnami MD, et al. The influence of transforming growth factor, cyclooxygenase-2, matrix metalloproteinase(MMP)-7, MMP-9 and CXCR4 proteins involved in epithelial-mesenchymal transition on overall survival of patients with gastric cancer[J]. Histopathology, 2012, 61(2): 153-161.
 [5] Kowluru RA, Zhong Q, Santos JM. Matrix metalloproteinases in diabetic retinopathy: potential role of MMP-9[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2012, 21(6): 797-805.
 [6] Hwang BM, Chae HS, Jeong YJ, et al. Protein tyrosine phosphatase controls breast cancer invasion through the expression of matrix metalloproteinase-9[J]. BMB Rep, 2013, 46(11): 533-538.
 [7] Reck M, Heigener DF, Mok T, et al. Management of non-small-cell lung cancer: recent developments[J]. Lancet, 2013, 382(93): 709-719.
 [8] Hu Y, Hu MM, Shi GL, et al. Imbalance between vascular endothelial growth factor and endostatin correlates with the prognosis of operable non-small cell lung cancer[J]. Eur J Surg Oncol, 2014, 40(9): 1136-1142.
 [9] Liu X, Zhang H, Yu X, et al. The correlation of expression of VEGF and EGFR with SUV of (18)FDG-PET-CT in non-small cell lung cancer[J]. Contemporary Oncology (Poznań, Poland), 2014, 18(5): 334-339.
 [10] Aresu L, Arico A, Comazzi S, et al. VEGF and MMP-9: biomarkers for canine lymphoma[J]. Vet Comp Oncol, 2014, 12(1): 29-36.
 [11] Takala H, Saamio J, Wiik H, et al. HIF-1 α and VEGF are associated with disease progression in esophageal carcinoma[J]. J Surg Res, 2011, 167(1): 41-48.
 [12] Stapley S, Peters TJ, Neal RD, et al. The risk of oesophago-gastric cancer in symptomatic patients in primary care: a large casecontrol study using electronic records[J]. Br J Cancer, 2013, 108(1): 25-31.
 [13] 顾咸庆, 杨雪琴, 杨宇馨, 等. APE1 和 VEGF 在非小细胞肺癌组织中的表达及其与肿瘤血管生成和预后的关系[J]. 重庆医学, 2012, 41(11): 1047-1050.
 [14] 唐成佳, 余天雾. NGAL 及 MMP9 在原发性肝癌患者血清中表达及意义[J]. 重庆医学, 2016, 45(17): 2357-2359.
 [15] 梁乃超. VEGF 和 MMP-9 检测对非小细胞肺癌患者疗效和预后评估的价值[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(17): 2529-2531.

(收稿日期: 2017-02-21 修回日期: 2017-04-29)

(上接第 2074 页)

经济市场, 2015, 12(4): 146-147.
 [10] 石咏梅. 脑缺血/再灌注神经钙离子通道的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(14): 2507-2509.
 [11] 赵滨, 白新宇, 董兴有, 等. 钙库调控的钙离子通道对大鼠膀胱平滑肌收缩性调控的研究[J]. 第三军医大学学报, 2014, 36(11): 1178-1182.
 [12] 杜春奇, 王岭梅, 赵卫兵. 颅内压监测在重型颅脑创伤手术中的应用[J]. 检验医学与临床, 2016, 13(17): 2550-

2551.
 [13] 陶宁, 汪翼, 杜柯君, 等. 亚低温治疗对重型颅脑损伤患者颅内压及脑液生化学指标的影响[J]. 海南医学院学报, 2015, 21(7): 933-935.
 [14] 朱小丽, 刘砚星, 钟宝贵, 等. 水杨酸钠对大鼠海马神经元电压门控性钙离子通道的影响[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(9): 1266-1270.

(收稿日期: 2017-03-13 修回日期: 2017-05-19)