

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.26.008

文章编号: 1005-8982(2017)26-0040-05

临床研究·论著

MMP-2、VEGF 在食管癌变过程中的作用研究*

徐志彬,袁丽,郑秀丽,王士杰,吴明利

(河北医科大学第四医院 内镜科,河北 石家庄 050011)

摘要: **目的** 研究活化的间质成纤维细胞表达的基质金属蛋白酶 2 (MMP-2) 及血管内皮生长因子 (VEGF) 蛋白在正常食管、食管癌前病变、早期食管癌、进展期食管癌发展过程中的作用。**方法** 免疫组织化学法检测 MMP-2 和 VEGF 蛋白在正常食管 20 例,低级别上皮内瘤变 30 例,高级别上皮内瘤变 50 例,早期癌 25 例,进展期癌 25 例中的表达。抗体 CD34 标记血管内皮细胞,检测微血管密度。**结果** 随食管癌变进展, MMP-2 蛋白在食管间质中的表达阳性率依次为 0% (0/20)、0% (0/30)、28% (14/50)、40% (10/25) 和 60% (15/25)。VEGF 蛋白在间质成纤维细胞中的表达阳性率依次为 0% (0/20)、3% (1/30)、26% (13/50)、36% (9/25) 和 52% (13/25), MMP-2 和 VEGF 蛋白在 5 组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 随着食管癌变进展,间质成纤维细胞发生活化,分泌表达的 MMP-2 逐渐增多,从而降解基底膜,促进癌的下侵;过度表达的 VEGF 蛋白促进间质微血管的形成,加速癌的进展和转移。

关键词: 癌相关纤维母细胞;基质金属蛋白酶;癌变;癌前病变

中图分类号: R735.1

文献标识码: A

Roles of MMP-2 and VEGF expressions in activated stromal fibroblasts during esophageal carcinogenesis*

Zhi-bin Xu, Li Yuan, Xiu-li Zheng, Shi-jie Wang, Ming-li Wu

(Department of Endoscopy, the Fourth Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050011, China)

Abstract: Objective To investigate the expressions of matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) proteins in the stromal fibroblasts in different esophageal lesions from normal tissue, precancerous lesion, to early carcinoma (CIS) and advanced carcinoma (EA). **Methods** IHC method was used to detect the expression of MMP-2 protein and VEGF protein in the stromal fibroblasts and epithelia in different lesions in esophageal carcinogenesis, including normal group (20 cases), low-grade intraepithelial neoplasia (LGIEN) group (30 cases), HGIEN group (50 cases), CIS group (25 cases) and EA group (25 cases) respectively. Antibody CD34 was used to label vascular endothelial cells for microvascular density detection. **Results** In the esophageal stromal fibroblasts of the normal, LGIEN, HGIEN, CIS and EA groups, the positive-expression rates of MMP-2 protein were 0% (0/20), 0% (0/30), 28% (14/50), 40% (10/25) and 60% (15/25) respectively; and the positive-expression rates of VEGF protein were 0.0% (0/20), 3.3% (1/30), 26.0% (13/50), 36.0% (9/25) and 52.0% (13/25) respectively. The positive expression rates of each protein had significant differences among the five groups ($P < 0.05$). **Conclusions** With esophageal cancer progression, the interstitial fibroblasts are activated, the secretion of MMP-2 protein increases, resulting in degradation of the basement membrane and promotion of cancer invasion. Excessive expression of VEGF protein promotes the formation of interstitial capillaries, accelerates cancer progression and metastasis.

Keywords: cancer-associated fibroblast; matrix metalloproteinase; carcinogenesis; precancerous lesion

收稿日期: 2016-09-02

* 基金项目: 河北省卫生厅 2015 年度医学科学研究重点课题计划项目 (No: 20150749)

[通信作者] 吴明利, E-mail: wu.ml@tom.com; Tel: 13933083646

癌相关纤维母细胞 (cancer-associated fibroblasts, CAFs) 在肿瘤发生、发展过程中发挥重要作用^[1-4]。CAF 的活化状态常为平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 阳性表达, 该类细胞的胶原蛋白和透明质酸合成明显增多, 分泌能力、增殖能力及侵袭能力发生显著改变。研究表明, 在食管癌变进程中, 食管间质中的成纤维细胞逐步发生活化, 在食管癌阶段即称为食管癌相关纤维母细胞; 观察发现食管癌前病变和早期癌阶段的活化间质成纤维细胞可见多种细胞因子和生长因子^[5-7]。除食管癌细胞以外, 活化的间质成纤维细胞也是基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的重要来源。在食管癌变的多个阶段, 间质中活化的间质成纤维细胞分泌的基质金属蛋白酶 2 (matrix metalloproteinase-2, MMP-2) 和 VEGF 蛋白在食管癌的侵袭和转移中是否会促进病变的血管生成和血运转移, 尚需进一步探讨和研究。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2006 年 1 月 -2012 年 12 月河北医科大学第四医院病理组织标本 150 例, 共分为 5 组: 正常食管组织 20 例, 低级别上皮内瘤变组 30 例, 高级别上皮内瘤变组 50 例, 早期癌组 25 例, 进展期癌组 25 例。本研究经过本院伦理委员会审批通过。

1.2 α -SMA、MMP-2 和 VEGF 蛋白检测

采用免疫组织化学一步法, 用已知阳性的人癌组织切片作阳性对照组, 以磷酸盐缓冲溶液代替一抗作阴性对照。 α -SMA 鼠抗人单克隆抗体和 CD34 鼠抗人单克隆抗体由北京西雅金桥生物技术有限公司提供, MMP-2 兔多抗免疫球蛋白 G、VEGF 兔多克隆抗体由美国 bioworld 公司提供, 工作浓度 1 : 100。

判断标准: 按照王立峰等^[8]的标准, 以间质成纤维细胞胞质中出现棕黄色颗粒为阳性细胞, 观察 5 个具有代表性的高倍镜视野 ($\times 400$), 无明显阳性细胞为 (-), 局灶阳性为 (+), 弥漫阳性为 (++) , 为便于统计, 将 (+)、(++) 合并为阳性。上皮细胞质及细胞膜中出现棕黄色颗粒为阳性细胞。在染色均匀的区域, 选取 5 个高倍镜视野 ($\times 400$), 根据阳性细胞所占百分比, $<1/3$ 为阴性表达, $\geq 1/3$ 为阳性表达。

1.3 食管癌变过程中微血管密度的测算

参照 MAEDA 等^[9]的方法, 先在 100 倍镜视野下

观察 CD34 阳性染色的微血管高密度区, 即热点区。在 400 倍镜视野下观察, 凡与周围细胞和结缔组织成份有明显区别的单个内皮细胞或内皮细胞簇作为 1 个微血管; 管腔直径 >8 个红细胞或肌层较厚的血管均不计数。记录 3 个高倍镜视野下的微血管数值, 取平均值作为每例食管癌变过程中的微血管密度 (microvessel density, MVD) 值。

1.4 统计学方法

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件, 计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较用方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验; 计数资料以率或百分比表示, 用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般资料

正常食管组织组 20 例, 男性 9 例, 平均年龄 (58.0 ± 2.1) 岁; 女性 11 例, 平均年龄 (62.0 ± 3.3) 岁。低级别上皮内瘤变组 30 例, 男性 20 例, 平均年龄 (58.0 ± 1.5) 岁; 女性 10 例, 平均年龄 (63.0 ± 1.8) 岁。高级别上皮内瘤变组 50 例, 男性 29 例, 平均年龄 (57.0 ± 1.1) 岁; 女性 21 例, 平均年龄 (60.0 ± 5.3) 岁。早期癌组 25 例, 男性 13 例, 平均年龄 (60.0 ± 2.3) 岁; 女性 12 例, 平均年龄 (63.0 ± 2.6) 岁。进展期癌组 25 例, 男性 13 例, 平均年龄 (60.0 ± 3.1) 岁; 女性 12 例, 平均年龄 (62.0 ± 4.5) 岁。各组性别比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 各组年龄呈正态分布, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 α -SMA 在食管癌变过程中的表达

α -SMA 阳性间质成纤维细胞呈梭形或条带样, 主要存在于癌前病变或癌巢周围间质中, 在进展期癌时密集呈条索状包裹着癌巢。 α -SMA 在正常食管组织成纤维细胞基本无表达 (0/20), 低级别上皮内瘤变组表达率为 10% (3/30), 高级别上皮内瘤变组表达率为 36% (18/50), 早期癌组表达率为 60% (15/25), 进展期癌组的表达率为 92% (23/25), α -SMA 表达阳性率组间比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。低级别上皮内瘤变组与正常食管组织组比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 高级别上皮内瘤变组、早期癌组及进展期癌组比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 1。

2.3 MMP-2 蛋白在食管癌变过程中的表达

MMP-2 蛋白表达主要定位于不典型增生上皮细胞、癌细胞、癌旁纤维母细胞及癌前病变间质中的

成纤维细胞,胞质着色。MMP-2 在正常食管上皮、低级别上皮内瘤变上皮不表达,在高级别上皮内瘤变组、早期癌组、进展期癌组上皮的表达率分别为 28%(14/50)、40%(10/25)及 60%(15/25)。低级别上

皮内瘤变组与正常食管组织组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);高级别上皮内瘤变组、早期癌组及进展期癌组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 1 和图 2。

表 1 临床病理特征与 α -SMA、MMP-2 及 VEGF 蛋白的关系 例(%)

临床病理特征	例数	α -SMA	χ^2 值	P值	MMP-2	χ^2 值	P值	VEGF	χ^2 值	P值
性别										
男	88	40(45)	2.069	0.150	33(38)	0.437	0.508	52(59)	0.005	0.943
女	62	23(37)			20(32)			37(60)		
年龄 例(%)										
<60 岁	72	30(41)	0.006	0.937	27(38)	0.284	0.594	42(58)	0.057	0.811
≥ 60 岁	78	33(42)			26(33)			47(60)		
病理级别										
正常食管组织	20	0(0)			0(0)			0(0)		
低级别上皮内瘤变	30	3(10)			0(0)			1(3)		
高级别上皮内瘤变	50	18(36)	57.553	0.000	28(14)	43.562	0.000	13(26)	26.170	0.000
原位癌	25	15(60)			10(40)			9(36)		
进展期癌	25	23(92)			15(60)			13(52)		

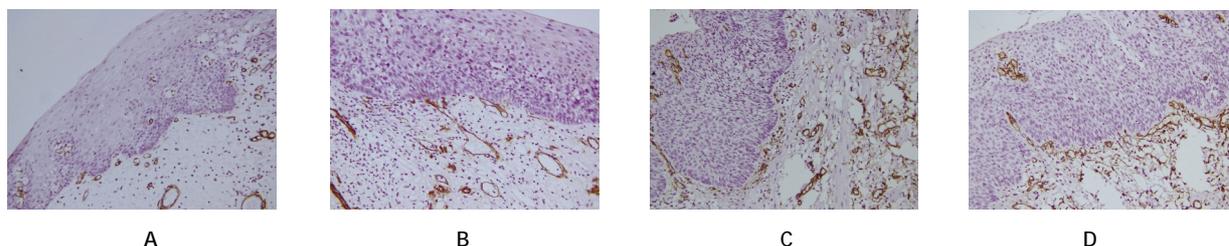


图 1 α -SMA 在食管不同病变阶段间质成纤维细胞中的表达 (免疫组织化学法 $\times 200$)

2.4 VEGF 在食管癌变过程中的表达

VEGF 蛋白表达主要定位于食管不典型增生上皮细胞、食管癌细胞、食管癌相关纤维母细胞及食管癌前病变间质中的成纤维细胞。正常食管鳞状上皮细胞不表达,低级别上皮内瘤变组表达率为 3%(1/30),

高级别上皮内瘤变组表达率为 26%(13/50),早期癌组表达率为 36%(9/25),进展期癌组的表达率为 52%(13/25)。低级别上皮内瘤变组与正常食管组织组比较,差异无统计学意义($P>0.05$);高级别上皮内瘤变组、早期癌组及进展期癌组比较,差异有统计学意

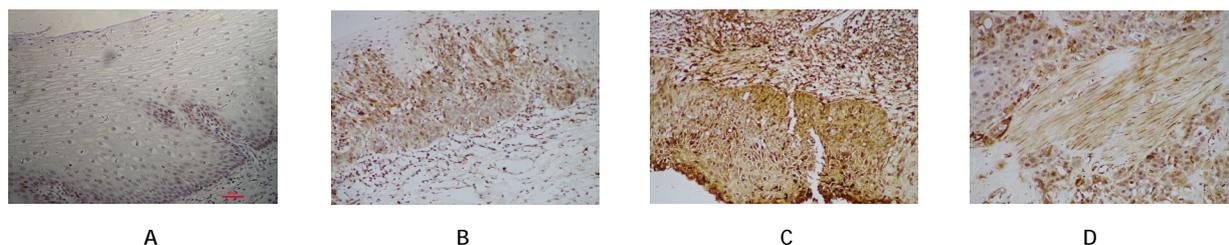
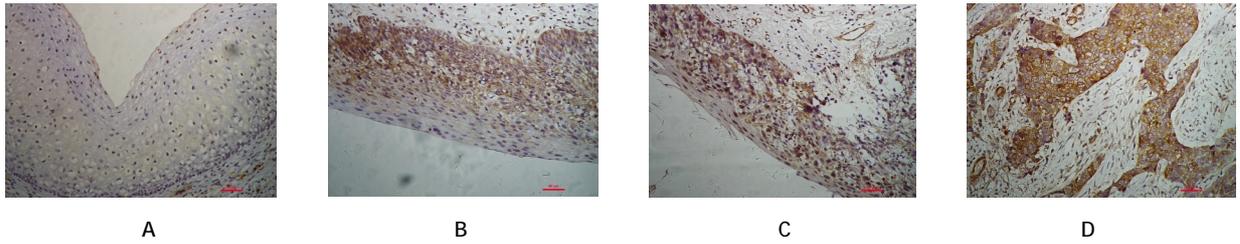


图 2 MMP-2 蛋白在食管不同病变阶段间质成纤维细胞中的表达 (免疫组织化学法 $\times 200$)



A: VEGF 在正常食管组织中阴性表达;B: VEGF 在低级别上皮内瘤间质成纤维细胞和不典型增生上皮中阳性表达;C: VEGF 在早期食管癌间质成纤维细胞和不典型增生上皮中阳性表达;D: VEGF 在进展期食管癌间质成纤维细胞和癌细胞中的阳性表达

图 3 VEGF 在食管不同病变阶段间质成纤维细胞中的表达 (免疫组织化学法 × 200)

义 ($P < 0.05$)。见表 1 和图 3。

2.5 MVD

正常食管和低级别上皮内瘤变黏膜下间质中血管稀疏,形态规则,而进展期癌血管数目明显增多,管腔直径大小不一,分布无序、杂乱,呈攀状。正常食管组织组 MVD 值为 (12.3 ± 1.6) ;低级别上皮内瘤变组为 (15.7 ± 2.0) ;高级别上皮内瘤变组为 (20.9 ± 2.2) ;早期癌组为 (26.4 ± 2.0) ;进展期癌组为 (30.0 ± 2.3) ,组间比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 临床病理特征与 MVD 的关系

临床病理特征	例数	MVD($\bar{x} \pm s$)	t/F 值	P 值
性别				
男性	88	21.2 ± 3.5	0.915	0.704
女性	62	17.1 ± 4.1		
年龄				
<60 岁	72	19.9 ± 2.1	0.723	0.688
≥60 岁	78	22.2 ± 3.0		
病理级别				
正常食管组织	20	12.3 ± 1.6	1.121	0.332
低级别上皮内瘤变	30	15.7 ± 2.0		
高级别上皮内瘤变	50	20.9 ± 2.2		
原位癌	25	26.4 ± 2.0		
进展期癌	25	30.0 ± 2.3		
α-SMA				
阴性	87	15.7 ± 2.5	1.851	0.040
阳性	63	22.8 ± 5.6		
VEGF				
阴性	61	15.1 ± 5.1	3.755	0.001
阳性	89	23.5 ± 6.1		

2.6 α-SMA、VEGF 蛋白与 MVD 的关系

α-SMA 阴性组的 MVD 值与 α-SMA 阳性组比较,差异有统计学意义 ($P < 0.05$);VEGF 阴性组的 MVD 值与 VEGF 阳性组比较,差异有统计学意义

($P < 0.05$)。

3 讨论

食管癌的发生、发展是一个多基因参与、多步骤的缓慢过程,上皮细胞的恶变起主导作用,活化的间质成纤维细胞能分泌多种细胞因子,其中 MMPs 在食管癌的侵袭和转移过程中发挥重要作用。研究发现,MMPs 的来源不仅限于癌细胞,癌间质中大量出现的 α-SMA 阳性的纤维母细胞也是 MMPs 的重要来源^[10-11]。MMPs 与肿瘤的浸润、转移密切相关,其中 MMP-2 与肿瘤的侵袭和转移过程密切相关^[12-14]。MMP-2 属于 MMPs 中的明胶酶,底物为基底膜上变性的胶原蛋白、明胶、IV 型胶原蛋白,不仅能降解基底膜糖蛋白及 ECM 成分,而且在肿瘤的新生血管形成中起着非常重要的作用。李书军等^[15]研究发现,MMP-2 主要在食管癌细胞浆内或包膜表达,正常组织中无表达,癌组织及转移灶中表达活性显著增强。DAVIES 等^[16]研究发现,MMP-2 的过表达与乳腺癌的组织学分级及侵袭能力有关,MMP-2 通过降解细胞外基质而破坏基底膜,使肿瘤细胞更易于浸润淋巴管。本研究发现,在正常食管组织和低级别上皮内瘤变中,食管间质成纤维细胞的 α-SMA 表达阴性或阳性率低,间质成纤维细胞未发生活化或活化率低,MMP-2 基本不表达或表达很弱,而在高级别上皮内瘤变和癌组织中,伴随着间质成纤维细胞的 α-SMA 表达阳性而大量活化,其表达 MMP-2 的能力也增强,尤其是在进展期癌间质组织中。提示在早期癌阶段甚至是癌前病变阶段,上皮细胞和间质成纤维细胞中 MMP-2 即开始逐渐蓄积,为肿瘤的侵袭转移做好准备。

有学者将癌相关母细胞、内皮细胞与癌细胞体外共同培养,发现内皮细胞和癌相关纤维母细胞都向肿瘤团块内浸润性生长^[17]。这表明癌相关纤维母细胞可促进肿瘤血管的形成。实验报道,癌相关纤维母

细胞促进微血管增生的能力比正常纤维母细胞高 4.7 倍,其聚集血管内皮细胞的能力是正常纤维母细胞的 4.2 倍^[8]。研究证实,在多种肿瘤组织中,活化的间质成纤维细胞可分泌多种生长因子和化学因子,如趋化因子、MMP-13、肝细胞生长因子(Hepatocyte growth factor, HGF)等,其通过各自的传导通路,交互或直接刺激 VEGF 蛋白的过表达,直接或间接刺激肿瘤血管生成^[19-21]。本研究发现,在食管癌变进程中,随着 α -SMA 蛋白的阳性表达,间质成纤维细胞逐步活化,VEGF 蛋白的表达阳性率逐渐增高,微血管密度逐渐升高。

以往肿瘤的治疗都是以癌细胞为靶目标,肿瘤微环境的提出打破传统的治疗理念,针对间质成纤维细胞开发的药物,如 HGF/c-Met signaling 抑制剂 SU11274、抗-HGF 单克隆抗体 NK4 等,在人体和动物抑制肿瘤浸润、转移中也取得初步成效。开发能够抑制和阻断 MMP-2、VEGF 的抑制剂,并联合其他靶点进行抗肿瘤治疗,也许能为治愈食管癌带来新的希望。

参 考 文 献:

- [1] XING F, SAIDOU J, WATABE K. Cancer associated fibroblasts (CAFs) in tumor microenvironment [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2010, 15(1): 166-179.
- [2] 蔡伟,康骅,刘晨,等. CAFs 对乳腺癌细胞生物学特性的影响及机制探讨[J]. *现代肿瘤医学*, 2014, 22(6): 1249-1253.
- [3] 房丽君,李剑. 来源于间充质干细胞的 CAFs 促进肿瘤生长[J]. *基础医学与临床*, 2014, 34(10): 1442-1445.
- [4] 李崖青,李帅,刘芳芳,等. 癌相关肌纤维母细胞与乳腺癌的研究进展[J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(2): 142-144.
- [5] XU Z B, WANG S J, WU M L, et al. TGF- β_1 and HGF protein secretion by esophageal squamous epithelial cells and stromal fibroblasts in oesophageal carcinogenesis[J]. *Oncology Letters*, 2013, 6(2): 401-406.
- [6] 徐志彬,冯军波,郑秀丽,等. 不同食管病变组织中 TGF- β_1 、 α -SMA、smad4、VEGF 蛋白表达及 MVD 比较 [J]. *山东医药*, 2016, 56(6): 10-12.
- [7] 徐志彬,冯军波,郑秀丽,等. 食管癌变进程中 HGF、c-met、VEGF 蛋白的表达变化及意义[J]. *山东医药*, 2016, 56(1): 9-11.
- [8] 王立峰,王瑞芬,郝兆星,等. 胃癌中肿瘤相关纤维母细胞蛋白表达改变及意义[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(20): 2263-2267.
- [9] MAEDA K, CHUNG Y S, OGAWA Y, et al. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma[J]. *Cancer*, 1996, 77(5): 858-863.
- [10] MICKE P, OSTMAN A. Tumour-stroma interaction: cancer-associated fibroblasts as novel targets in anti-cancer therapy [J]. *Lung Cancer*, 2004, 45(2): S163-S175.
- [11] 单丽辉,张思,翟丽丽,等. 癌相关纤维母细胞对胃癌细胞增殖、凋亡、迁移和侵袭活性的影响[J]. *实用肿瘤学杂志*, 2012, 26(2): 97-101.
- [12] 贾宗良,朱宏升,柴明明,等. 甲状腺乳头状癌中 MMP2、COX-2、VEGF 和 MVD 的表达及临床意义[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2015, 36(3): 362-367.
- [13] 刘桂云,滕学芹,于辉. HMGB1、NF- κ Bp65、MMP2 在子宫内膜腺癌组织中的表达及相关性研究[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2014, 23(6): 538-543.
- [14] 陈一峰,钟清木,张白凌. Kiss-1、MMP2、TIMP2 蛋白在甲状腺乳头状癌中的表达及临床意义[J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2014, 23(2): 137-141.
- [15] 李书军,关宏恩,邢清海,等. Artemin 和基质金属蛋白酶 2 在食管鳞癌中的表达及其临床意义[J]. *广东医学*, 2010, 31(19): 2566-2568.
- [16] DAVIES B, MILES D W, HAPPERFIELD L C, et al. Activity of type IV collagenases in benign and malignant breast disease[J]. *Brit Cancer*, 1993, 67(5): 1126-1131.
- [17] WALTER-YOHLING J, PRATT B M, LEDBETTER S, et al. Myofibroblasts enable invasion of endothelial cells into three-dimensional tumor cell clusters: a novel in vitro tumor model[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2003, 52(4): 263-269.
- [18] ORIMO A, GUPTA P B, SGRIOI D C, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinoma promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion[J]. *Cell*, 2005, 121(3): 335-348.
- [19] GERBER P A, HIPPE A, BUHREN B A, et al. Chemokines in tumor associated angiogenesis[J]. *Biol Chem*, 2009, 390(12): 1213-1223.
- [20] AUGSTEN M, HAGGLOF C, OLSSON E, et al. CXCL14 is an autocrine growth factor for fibroblasts and acts as a multi-modal stimulator of prostate tumor growth[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106(9): 3414-3419.
- [21] LEDERLE W, HARTENSTEIN B, MEIDES A, et al. MMP13 as a stromal mediator in controlling persistent angiogenesis in skin carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(7): 1175-1184.

(童颖丹 编辑)