

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2018.13.010

文章编号: 1005-8982 (2018) 13-0057-05

Integrin β_1 和 MMP-9 在结直肠癌组织中的表达及其与临床预后的关系

罗冲¹, 张向东¹, 吴艳林², 王新伟³

(河南省南阳市中心医院 1. 消化内科, 2. 肿瘤内科, 3. 普外科, 河南 南阳 473009)

摘要: **目的** 探究整合素 β_1 (Integrin β_1) 和基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 在结直肠癌组织中的表达情况及其与临床预后之间的关系。**方法** 选取 2008 年 3 月-2011 年 3 月经该院确诊为结直肠癌的 52 例患者的病理标本及 31 例正常肠黏膜组织标本, 通过免疫组织化学链霉亲和素过氧化物酶连接方法 (Immunohistochemical SP) 测定 Integrin β_1 及 MMP-9 蛋白的分布和表达情况, 分析其表达与结直肠癌的部分病理特征参数之间的关系。依据患者病变情况的不同采用相应的手术治疗后进行随访, 评价其术后复发情况及 5 年生存率。**结果** 免疫组织化学结果显示 Integrin β_1 蛋白在结直肠癌组织、癌旁组织及正常肠黏膜组织中的阳性表达率分别为 82.69%、14.29% 及 6.45%。MMP-9 在结直肠癌组织、癌旁组织及正常肠黏膜组织中的阳性表达率分别为 80.77%、16.67% 及 9.68%。Integrin β_1 及 MMP-9 在结直肠癌中的表达水平均与患者 Dukes 分期、肝转移相关 ($P < 0.05$)。两者在结直肠癌组织中的表达呈正相关, 同时结直肠癌患者 Integrin β_1 及 MMP-9 的蛋白表达与术后复发率、术后生存时间均呈负相关。**结论** Integrin β_1 及 MMP-9 在结直肠癌组织中表达升高, 两者皆与结直肠癌的病理特征和肿瘤的侵袭转移密切相关, 同时影响结直肠癌患者的术后复发及生存, 此外在结直肠癌发病的过程中两者的高表达可能具有协同作用, 所以 Integrin β_1 及 MMP-9 可以作为今后治疗和预后结直肠癌的新靶点。

关键词: 整合素 β_1 ; 基质金属蛋白酶 9; 结直肠癌

中图分类号: R735.3

文献标识码: A

Expressions of integrin β_1 and MMP-9 in colorectal cancer and their correlations with clinical prognosis

Chong Luo¹, Xiang-dong Zhang¹, Yan-lin Wu², Xin-wei Wang³

(1. Department of Gastroenterology, 2. Department of Oncology, 3. Department of General Surgery, Nanyang Central Hospital, Nanyang, Henan 473009, China)

Abstract: Objective To study the expressions and clinical prognosis of integrin β_1 and MMP-9 in colorectal cancer and their correlations with clinical prognosis. **Methods** In this study, 52 cases of colorectal carcinoma tissues and 31 specimens of normal colorectal mucosa were collected in our hospital between March 2008 and March 2011. The expressions and distribution of integrin β_1 and MMP-9 proteins were examined by immunohistochemical SP method. And then, the relationships of integrin β_1 and MMP-9 expressions with clinical pathological features of colorectal cancer were analyzed. After appropriate surgical treatment, the patients accepted a 5-year follow-up for evaluation of their recurrent situation and 5-year survival rate. **Results** Immunohistochemistry showed that the positive expression rate of integrin β_1 in the colorectal carcinoma tissues, adjacent normal colonic tissues and normal colorectal mucosa were 82.69%, 14.29% and 6.45% respectively. The positive expression rate of MMP-9 in the colorectal carcinoma tissues, adjacent normal colonic tissues and normal colorectal mucosa were 80.77%, 16.67% and 9.68% respectively. And the expression levels of integrin β_1 and MMP-9 were correlated to the Dukes staging and liver metastasis ($P < 0.05$). Besides, integrin β_1 and MMP-9 expression levels were positively correlated, and they

收稿日期: 2017-01-17

were both negatively correlated to the recurrence rate and 5-year survival rate ($P < 0.05$). **Conclusions** Integrin β_1 and MMP-9 may be involved in colorectal cancer. And the expression levels of integrin β_1 and MMP-9 are in positive correlations with pathological features and tumor metastasis, and both are related to patients' recurrent situation and 5-year survival rate. In addition, they may have the synergic effect in the development of colorectal cancer. All the data showed that the two proteins are likely to be potential targets for treatment and prognosis prediction of colorectal cancer.

Keywords: integrin β_1 ; MMP-9; colorectal cancer

结直肠癌是一种常见的消化系统肿瘤, 尽管大多数患者可及时进行相应的手术治疗, 但其淋巴转移依然是术后复发以及影响患者生存的一个重要因素^[1-2], 对结直肠癌转移及其相关机制的研究具有重要的临床意义。细胞的黏附反应作为肿瘤淋巴转移及远距脏器转移的关键环节^[3-5], 近年来成为研究者专注的重要课题之一。整合素 (Integrins) 是细胞黏附分子家族的重要一员, 介导细胞与细胞外基质以及细胞与细胞之间的黏附反应, 从而影响细胞的增殖、迁移、凋亡等生物学特性^[6-7]。整合素 β_1 (Integrin β_1) 则是该家族最大的亚群, 已被报道在多种肿瘤中异常表达, 如头颈部肿瘤、食管鳞癌、乳腺癌等^[8-10]。基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase-9, MMP-9) 则属于基质金属蛋白酶 (MMPs) 超家族中的明胶酶, 可降解细胞外基质, 广泛参与肿瘤、炎症、心血管系统等多种疾病的发生发展过程。研究发现^[11-13] 细胞外基质的降解是肿瘤侵袭转移的基本步骤, 包括胃癌、宫颈鳞癌、淋巴瘤肿瘤中出现 MMPs 家族的异常表达。但对于 Integrin β_1 及 MMP-9 与结直肠癌临床关系的系统性研究报道甚少。本文通过检测结直肠癌组织中 Integrin β_1 及 MMP-9 蛋白的分布和表达情况探讨其与结直肠癌浸润转移及临床分期的关系, 分析其临床意义, 并于术后对患者进行随访, 初步评价 Integrin β_1 及 MMP-9 的表达与临床疗效之间的关系。

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取 2008 年 3 月 -2011 年 3 月于南阳市中心医院确诊为结直肠癌的 52 例患者的病理标本及 31 例正常肠黏膜组织标本。所有入选病例均经患者知情同意且入院之前未接受过放、化疗或手术治疗。其中, 男性 37 例, 女性 15 例; 年龄 21 ~ 67 岁, 平均 53 岁; 病程 2 ~ 4 年, 平均 2.6 年。依据患者具体情况进行相应治疗后保存患者的癌组织切片, 同时详细录入其临床病理资料, 以备后续分析。另收集癌旁配对组织标本 42 例及 31 例非肠癌患者的正常肠黏膜组织标本

作对照研究。

纳入患者均在接受相应的治疗之后参与随访调查, 其中失访 2 例。随访 1 年后死亡 6 例, 随访 3 年后死亡 14 例, 随访 5 年后死亡 29 例。其中 27 例死于肿瘤术后转移、复发, 2 例死于其他疾病。

1.2 免疫组织化学链霉亲和素过氧化物酶连接方法 (Immunohistochemical SP)

将癌组织标本、癌旁配对组织标本及正常肠黏膜组织标本用 10% 甲醛浸泡固定, 常规脱水及石蜡包埋后冷冻切片, 免疫组织化学染色方法参照 SP 试剂盒 (购自北京中杉金桥生物公司) 的说明书进行操作。鼠抗人 Integrin β_1 单克隆抗体及鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体购自美国 Santa Cruz 公司, 磷酸盐缓冲液 PBS 替代一抗作为阴性对照。

结果判定, Integrin β_1 和 MMP-9 均以细胞膜和/或胞质着棕黄色颗粒为阳性^[7]。参考文献 [8] 的半定量方法评定染色结果, 即根据阳性细胞的数量和染色强度进行计分: ①染色强度的记分标准, 不着色记 0 分、轻度着色 (略强于阴性对照, 表现为淡黄色颗粒) 记 1 分、中度着色记 2 分、重度着色记 3 分; ②阳性细胞数量的记分标准, <10% 的细胞着色记 1 分、10% ~ 50% 的细胞着色记 2 分、>50% 的细胞着色记 3 分。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 计数资料行 χ^2 检验或校正 χ^2 检验, 两两比较采用 χ^2 分割法, 检验水准 $\alpha = 0.0167$, 相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, 采用乘积极限法 (Kaplan-Meier Method) 分析生存率, 采用 Logrank 法检验生存分析差异, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织中表达

免疫组织化学 SP 法染色结果显示在结直肠癌组

组织、癌旁组织以及正常肠黏膜组织的细胞膜和 / 或胞质中均可见黄色着色颗粒 (见图 1), 说明 Integrin β_1 和 MMP-9 在结直肠癌组织、癌旁组织及正常肠黏膜组织中均有表达。Integrin β_1 蛋白在结直肠癌组织、癌旁组织和正常肠黏膜组织中的阳性表达率分别为 82.69%、14.29% 及 6.45%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); MMP-9 在结直肠癌组织、癌旁组织及正常肠黏膜组织中的阳性表达率分别为 80.77%、16.67% 及 9.68%, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (见表 1)。Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌组织中表达水平与临床病理指标间的关系经进一步统计学分析显示, Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白的表达与肝转移和 Dukes 分期相关 ($P < 0.05$) (见表 2)。

2.2 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达与术后生存时间的关系

本实验随访期限为 5 年, 其中失访 2 例。在结直肠癌组织中, Integrin β_1 表达阳性组的平均生存时间

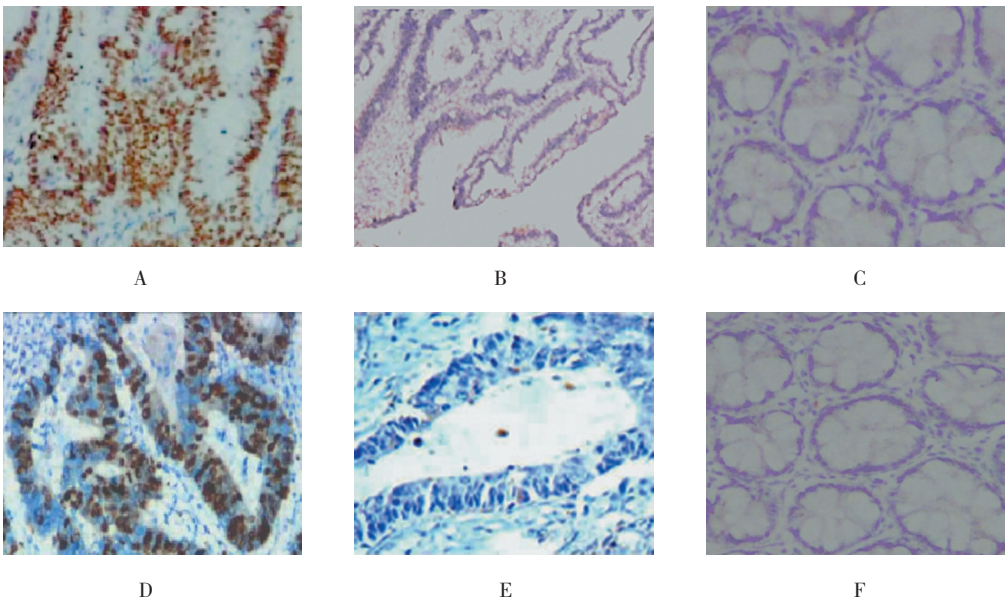
为 (32.34 ± 1.93) 个月, Integrin β_1 表达阴性组的平均生存时间为 (53.5 ± 1.3) 个月, 两组比较差异有统计学意义 ($P = 0.001$) (见图 2)。MMP-9 表达阳性组的平均生存时间为 (30.05 ± 2.17) 个月, MMP-9 表达阴性组的平均生存时间为 (49.31 ± 1.19) 个月, 两组比较差异有统计学意义 ($P = 0.004$) (见图 3)。

2.3 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达与术后复发的关系

对 52 例患者进行随访的过程中, 失访 2 例, 2 例死于其他疾病, 48 例纳入考察。发现有 27 例患者术后出现复发, 其中 5 例再次进行手术。术后复发情况与 Integrin β_1 和 MMP-9 2 种蛋白表达水平的关系见表 3, Integrin β_1 表达阳性组的复发率高于阴性组, MMP-9 表达阳性组的复发率同样高于阴性组。

2.4 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达的相关性分析

Integrin β_1 和 MMP-9 2 种蛋白的表达呈正相关 ($r = 0.981, P = 0.001$)。见表 4。



A: 结直肠癌组织中 Integrin β_1 蛋白阳性表达; B: 癌旁组织中 Integrin β_1 蛋白阴性表达; C: 正常肠黏膜组织中 Integrin β_1 蛋白阴性表达; D: 结直肠癌组织中 MMP-9 蛋白阳性表达; E: 癌旁组织中 MMP-9 蛋白阴性表达; F: 正常肠黏膜组织中 MMP-9 蛋白阴性表达

图 1 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达结果 (免疫组织化学 SP 法染色 $\times 400$)

表 1 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达

组别	Integrin β_1		χ^2 值 [†]	P 值	MMP-9		χ^2 值 [†]	P 值
	(+)	(-)			(+)	(-)		
结直肠癌 ($n = 52$)	43	9			42	10		
癌旁 ($n = 42$)	6	36	49.123	0.006	7	35	38.262	0.007
正常肠黏膜 ($n = 31$)	2	29	51.124	0.004	3	28	39.954	0.007

注: [†] χ^2 分割法

表 2 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达和结直肠癌患者临床病理特点的关系

临床病理特点	Integrin β_1 （阳性 / 总例数）	χ^2 值	<i>P</i> 值	MMP-9（阳性 / 总例数）	χ^2 值	<i>P</i> 值
肿块大小						
<5 cm	21/27	0.094	0.825	19/27	0.286	0.713
≥ 5 cm	22/25			23/25		
Dukes 分期						
A	3/5	10.274	0.037	1/5	13.661	0.012
B	15/22			18/22		
C	14/14			13/14		
D	11/11			10/11		
淋巴结转移						
有	28/29	0.863	0.692	27/29	0.481	0.706
无	15/23			15/23		
肝转移						
有	28/28	10.214	0.011	27/28	6.051	0.039
无	15/24			15/24		

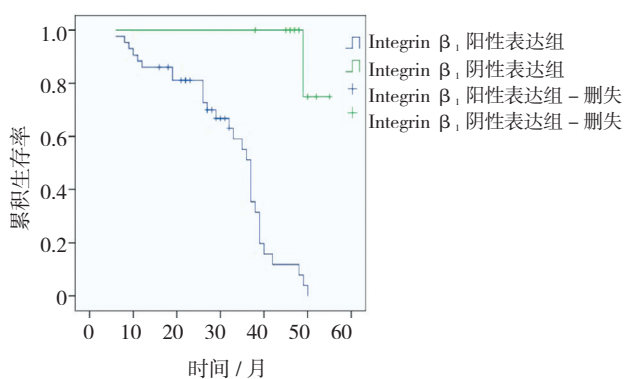
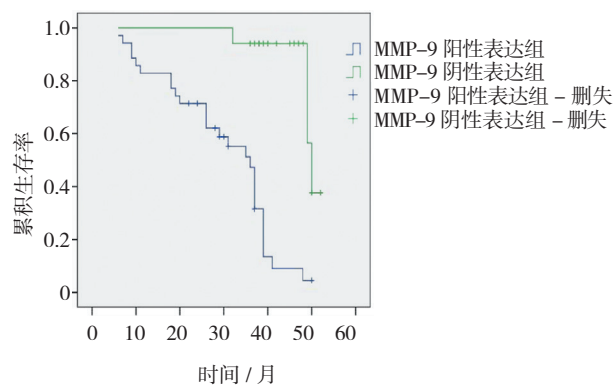
图 2 结直肠癌组织中 Integrin β_1 对患者术后生存时间的影响

图 3 结直肠癌组织中 MMP-9 对患者术后生存时间的影响

表 3 结直肠癌术后复发与 Integrin β_1 和 MMP-9 表达水平的关系

组别	Integrin β_1		χ^2 值	P 值	MMP-9		χ^2 值	P 值
	(+)	(-)			(+)	(-)		
术后复发 ($n=27$)	26	1	7.056	0.017	27	0	9.752	0.012
术后未复发 ($n=21$)	13	7			13	8		

表 4 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达的相关性

Integrin β_1	MMP-9	
	(+)	(-)
(+)	34	9
(-)	8	3

3 讨论

恶性肿瘤的一个重要生物学特性即是其极强的

侵袭迁移能力, 该能力不仅关系着患者的临床治疗效果及预后, 还是患者术后复发及生存率下降的主要原因。结直肠癌作为一种常见的消化系统肿瘤, 其侵袭迁移过程也是研究者们关注的重点之一。结直肠癌的远距脏器转移及侵袭是一个多因素共同参与的复杂过程, 其中细胞的黏附是一个重要的环节。本研究通过对 52 例结直肠癌患者的病理标本、42 例癌旁组织标本及 31 例非肠癌患者正常肠黏膜组织标本的对照研

究, 分析与细胞黏附密切相关的 2 个因子 Integrin β_1 和 MMP-9 在结直肠癌中的表达情况。

免疫组织化学染色结果显示, Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白在结直肠癌患者的病理组织中表达高于癌旁组织及正常肠黏膜组织, 证实 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白的表达与肿瘤的发生有密切的关系。同时对患者的临床病理资料进行统计学分析, 结果显示 Integrin β_1 和 MMP-9 的表达与结直肠癌的肝转移和 Dukes 分期相关。Integrin β_1 蛋白的表达对判断结直肠癌的病理进程和分期具有重要的参考意义, Integrin β_1 和 MMP-9 可作为新的衡量结直肠癌病理进程及转移的分子标记物。

此外本研究还分析了患者的 5 年生存情况及术后复发情况与这 2 种蛋白之间的关系。结果发现, Integrin β_1 和 MMP-9 阳性表达组的患者术后复发率高于阴性组, 且 5 年术后生存时间明显缩短, 不利于患者预后。MMP-9 属于基质 MMPs 超家族的一员, 大量的研究均证实 MMPs 表达增强或活性增加可导致结直肠癌的不良预后^[14-15], 与本研究结果具有一致性。MMP-9 的表达受多种调节因子的影响, 有研究表明^[16], 整合素家族中 Integrin $\alpha_v\beta_3$ 可促进肿瘤细胞的分泌, 诱导 MMPs 的激活, 参与肿瘤的侵袭迁移。本研究分析结直肠癌中 Integrin β_1 和 MMP-9 蛋白表达的相关性, 结果显示两者的表达呈正相关, 提示 Integrin β_1 和 MMP-9 在结直肠癌的侵袭转移中具有协同作用, 但是两者参与调控肿瘤转移的具体作用机制还有待进一步的研究。

综上所述, Integrin β_1 及 MMP-9 在结直肠癌组织中表达升高, 两者皆与结直肠癌的病理特征和肿瘤的侵袭转移密切相关, 同时影响结直肠癌患者的术后复发及生存, 此外在结直肠癌发病的过程中两者的高表达可能具有协同作用, 所以 Integrin β_1 及 MMP-9 可以作为今后治疗和预后结直肠癌的新靶点。

参 考 文 献:

- [1] GIULIANI J, BONETTI A. The pharmacological costs of complete liver resections in unselected advanced colorectal cancer patients: focus on targeted agents. A review of randomized clinical trials[J]. J Gastrointest Cancer, 2016, 47(4): 341-350.
- [2] MORIARTY A, O'SULLIVAN J, KENNEDY J, et al. Current targeted therapies in the treatment of advanced colorectal cancer: a review[J]. Ther Adv Med Oncol, 2016, 8(4): 276-293.
- [3] ARITA T, ICHIKAWA D, KONISHI H, et al. Tumor exosome-mediated promotion of adhesion to mesothelial cells in gastric cancer cells[J]. Oncotarget, 2016, 7(35): 56855-56863.
- [4] HAASE G, GAVERT N, BRABLETZ T, et al. the wnt target gene 11 in colon cancer invasion and metastasis[J]. Cancers (Basel), 2016, 8(5): E48.
- [5] SLUITER N, DE CUBA E, KWAKMAN R, et al. Adhesion molecules in peritoneal dissemination: function, prognostic relevance and therapeutic options[J]. Clin Exp Metastasis, 2016, 33(5): 401-416.
- [6] PAN L, ZHAO Y, YUAN Z, et al. Research advances on structure and biological functions of integrins[J]. Springer Plus, 2016, 5(1): 1094.
- [7] THARMALINGAM S, HAMPSON D R. The Calcium-Sensing Receptor and Integrins in Cellular Differentiation and Migration[J]. Front Physiol, 2016, 7: 190.
- [8] XU Y, ZHANG H, LIT LC, et al. The kinase LMTK3 promotes invasion in breast cancer through GRB2-mediated induction of integrin β_1 [J]. Sci Signal, 2014, 7(330): ra58.
- [9] ZSCHEPPANG K, KURTH I, WACHTEL N, et al. efficacy of beta1 integrin and egfr targeting in sphere-forming human head and neck cancer cells[J]. J Cancer, 2016, 7(6): 736-745.
- [10] VAY C, HOSCH S B, STOECKLEIN N H, et al. Integrin expression in esophageal squamous cell carcinoma: loss of the physiological integrin expression pattern correlates with disease progression[J]. PLoS One, 2014, 9(11): e109026.
- [11] DARLIX A, LAMY P J, LOPEZ-CRAPEZ E, et al. Serum HER2 extra-cellular domain, S100 β and CA 15-3 levels are independent prognostic factors in metastatic breast cancer patients[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 428.
- [12] VERMA S, KESH K, GUPTA A, et al. An overview of matrix metalloproteinase 9 polymorphism and gastric cancer risk[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 16(17): 7393-7400.
- [13] SOLOVYEVA N I, TIMOSHENKO O S, GUREEVA T A, et al. Matrix metalloproteinases and their endogenous regulators in squamous cervical carcinoma (review of the own data)[J]. Biomed Khim, 2015, 61(6): 694-704.
- [14] HERSZÉNYI L, HRITZ I, LAKATOS G, et al. The behavior of matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13(10): 13240-13263.
- [15] GROBLEWSKA M, MROCZKO B, SZMITKOWSKI M. The role of selected matrix metalloproteinases and their inhibitors in colorectal cancer development[J]. Postepy Hig Med Dosw (Online), 2010, 64: 22-30.
- [16] COHEN K, FLINT N, SHALEV S, et al. Thyroid hormone regulates adhesion, migration and matrix metalloproteinase 9 activity via $\alpha_v\beta_3$ integrin in myeloma cells[J]. Oncotarget, 2014, 5(15): 6312-6322.

(张蕾 编辑)