论著

文章编号:1000-5404(2009)06-0518-04

应用组织芯片技术研究非小细胞肺癌中MMP-2、MMP-9的表达及临床病理意义

唐春兰[1],杨和平[1],卞修武[2],王清良[2],章 容[2] (第三军医大学西南医院:[1]呼吸内科,[2]病理学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 利用组织芯片技术,结合免疫组化方法,研究基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在非小细胞肺癌(NSCLC)的表达及临床病理意义。**方法** 80例NSCLC石蜡标本制成组织芯片,免疫组化(S-P)法检测MMP-2、MMP-9表达。**结果** MMP-2、MMP-9在NSCLC中均有较高表达率,分别为81.25%(65/80)和73.75%(59/80),而且二者表达呈高度正相关;MMP-2、MMP-9的表达在NSCLC性别、年龄、肿块大小、病理类型、分化程度上无显著差异($P>0.05$);有淋巴结转移的患者MMP-2、MMP-9的阳性表达率分别为84.72%(61/72)及77.78%(56/72),无淋巴结转移的患者MMP-2、MMP-9的阳性表达率分别为50%(4/8)及37.50%(3/8)($P<0.05$);临床分期为Ⅰ+Ⅱ期患者MMP-2、MMP-9的阳性表达率分别为57.14%(16/28)及53.57%(15/28),Ⅲ期患者MMP-2、MMP-9的阳性表达率分别为94.23%(49/52)及84.61%(44/52)($P<0.05$)。**结论** 利用组织芯片技术,结合免疫组化法可以快速、高效地检测MMP-2、MMP-9在NSCLC中的表达;MMP-2、MMP-9在NSCLC中的表达与患者性别、年龄、肿块大小、病理类型、分化程度无关,而有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组,且随着临床分期增加表达明显升高;MMP-2、MMP-9的过度表达与NSCLC的发展、淋巴结转移有密切关系,可作为临床评估NSCLC进展的重要指标之一。

关键词: 非小细胞肺癌;组织芯片;免疫组化;MMP-2;MMP-9

中图法分类号: R730.23;R730.43;R734.2 **文献标识码:** A

Clinicopathological significance of MMP-2 and MMP-9 expressions in non-small cell lung cancer: a tissue microarray study

TANG Chun-lan[1], YANG He-ping[1], BIAN Xiu-wu[2], WANG Qing-liang[2], ZHANG Rong[2] (Department of Respiratory Diseases, [2]Institute of Pathology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the expressions of MMP-2 and MMP-9 in non-small cell lung cancer (NSCLC) through tissue microarray technique and immunohistochemical method and investigate the clinicopathological significance. **Methods** Totally 80 NSCLC specimens and 10 normal lung tissue samples were constructed into tissue microarray, and then immunohistochemical staining (S-P) was performed on these tissue chips. Chi-square test was employed for statistical analysis. **Results** The positive rates of MMP-2 and MMP-9 were 81.25% (65/80) and 73.75% (59/80) respectively, which had no significant difference in sex, age, size of tumor, histology and differentiation ($P>0.05$). The positive rates of MMP-2 and MMP-9 were significantly higher in the cases with lymphnode metastasis [84.72% (61/72) and 77.78% (56/72)] than those without lymphnode metastasis [50% (4/8) and 37.50% (3/8), $P<0.05$]. The cases at stage Ⅲ had a positive rate of 94.23% (49/52) in MMP-2 expression and of 84.61% (44/52) in MMP-9 expression, while for those at stage Ⅰ+Ⅱ, the rates were 57.14% (16/28) and 53.57% (15/28) with significant difference between the 2 groups. The expression of MMP-2 and MMP-9 was positively correlated. **Conclusion** The combination of tissue microarray and immunohistochemical assay is fast and effective to examine MMP-2 and MMP-9 expressions in NSCLC. The expressions of MMP-2 and MMP-9 are closely associated with lymphnode metastasis and clinical stages, but not with sex, age, size of tumor, histology and differentiation. Overexpressions of MMP-2 and MMP-9 are closely correlated to the progression, lymphnode metastasis of NSCLC, and may

基金项目: 重庆市自然科学基金(2005BB5299)

Supported by the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5299)

作者简介: 唐春兰,女,四川省华蓥市人,博士研究生,主治医师,讲师,主要从事肺癌诊断及治疗方面的研究。电话:(023)68765679,E-mail: chunlantangok@yahoo.com.cn

收稿日期: 2008-11-11;**修回日期:** 2008-12-08

be used as an index for evaluation of the NSCLC progression.

Key words: non-small cell lung cancer; tissue microarray; immunohistochemistry; matrix metalloproteinases-2; matrix metalloproteinases-9

肺癌的侵袭和转移是一个多阶段、多步骤、多种成分参与的序贯连续过程,在此过程中,肿瘤组织对基底膜和细胞外基质的降解是肿瘤细胞能否形成转移的关键步骤,目前研究认为基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)系统是参与此过程的最重要的酶系统[1]。组织芯片又称组织微阵列(tissue microarray),是快速、经济、大规模筛查组织中基因结构改变、表达异常的强有力工具[2]。本研究通过构建非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)组织芯片,应用免疫组织化学方法,检测基质金属蛋白酶 MMP-2 和 MMP-9 的表达,探讨其与肺癌患者性别、年龄、肿块大小、组织类型、分化程度和有否淋巴结转移以及临床分期的关系。

1　材料与方法

1.1　标本来源与处理

共收集 2005 年 9 月至 2007 年 3 月本院胸外科 NSCLC 手术标本 83 例(其中鳞癌 44 例,腺癌 24 例,肺泡细胞癌 8 例,腺鳞癌 5 例,大细胞癌 1 例,神经内分泌癌 1 例);另从本院病理研究所档案材料中选取 2003 – 2004 年手术 NSCLC 石蜡包埋组织 26 例(其中腺癌 21 例,鳞癌 5 例)。从上述 109 例病例中选取肺鳞癌 40 例,肺腺癌 40 例。其中男性 68 例(鳞癌 38 例,腺癌 30 例),女性 12 例(鳞癌 2 例,女性 10 例);分化程度:高分化 21 例(其中鳞癌 10 例 ,腺癌 11 例),中分化 52 例(其中鳞癌 28 例,腺癌 24 例),低分化 7 例(其中鳞癌 2 例,腺癌 5 例);有淋巴结转移者 72 例(其中鳞癌 37 例,腺癌 35 例),无淋巴结转移者 8 例(其中鳞癌 3 例,腺癌 5 例);临床分期:Ⅰ期 8 例(其中鳞癌 3 例,腺癌 5 例),Ⅱ期 20 例(其中鳞癌 9 例,腺癌 11 例),Ⅲ期 52 例(其中鳞癌 28 例,腺癌 24 例)。另选 10 例非肺部疾病死亡尸检肺组织作对照。患者术前均未经过化疗及放疗。

1.2　主要试剂

鼠抗人 MMP-2、MMP-9 单克隆抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。组织芯片仪购自美国 Beecher Instruments 公司。载玻片(上海精轮工业玻璃有限公司)用 1∶10 的多聚赖氨酸溶液处理。

1.3　方法

1.3.1　组织芯片的制作　　在 HE 切片上选择癌组织、癌旁组织各 2 点,对照切片,在石蜡块上进行相应标记。制作受体蜡块,平整蜡块表面,厚度以 1.0 ~ 1.2 cm 为宜。把受体蜡块固定在固定槽中,调节 X、Y 轴上微量标尺指示器为零,调节组织芯片仪左边的距离定位螺丝,确定打孔深度为 3 mm,然后向下打孔。移走细针,用粗针对准预先做好的标记,挖取供体组织。然后将粗针里的供体组织放入受体蜡块的孔中。全部点样完毕,取出组织芯片蜡块,放入 37 ℃烤箱中 15 min。取出后,用载玻片平整蜡块表面,然后按照常规石蜡切片方法进行切片,装盒备用。

1.3.2　免疫组化染色及结果判定　　采用 S-P 法进行免疫组化染色。一抗包括 MMP-2、MMP-9 抗体。PBS 替代一抗作空白对照,正常肺组织作正常对照。按着色强度分为:阴性(-),细胞无着色;弱阳性(+),细胞着色呈浅黄色;中度阳性(++),细胞着色呈棕黄色;强阳性(+++),细胞着色呈棕褐色。+ ~ +++ 计为阳性。

1.4　统计学分析

采用 SPSS 9.0 统计软件行 χ^2 检验。

2　结果

2.1　组织芯片构建情况

成功构建了含有 340 个点(每例各取癌组织 2 点,癌旁组织 2 点,正常肺组织每例各取 2 点)的非小细胞肺癌组织的微阵列蜡块,由此切片得到非小细胞肺癌组织芯片(图 1)。各点组织的形态结构均有很好的代表性,能反映原病理切片的结构特点。

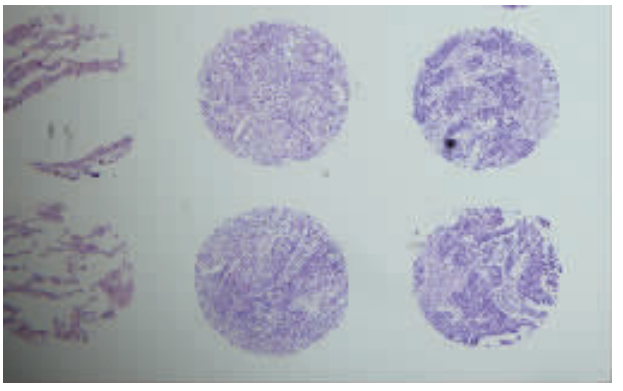


图 1　非小细胞肺癌(NSCLC)组织芯片构建情况　(×10)

2.2　免疫组化结果

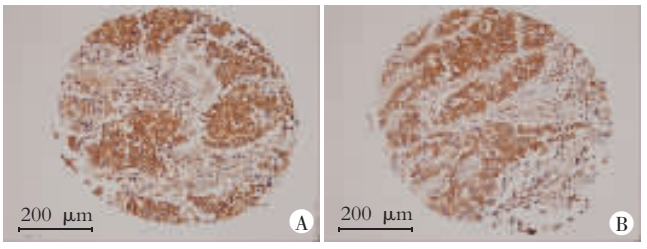
2.2.1　MMP-2、MMP-9 染色结果　　MMP-2、MMP- 9 主要表达于肿瘤细胞的细胞质中(图 2、3),正常对照组无阳性表达。

2.2.2　MMP-2、MMP-9 阳性表达与性别、年龄、肿块大小的关系　　MMP-2、MMP-9 阳性表达与 NSCLC 患者的性别、年龄、肿块大小无统计学差异($P > 0.05$, 表 1)。

2.2.3　MMP-2、MMP-9 阳性表达与病理类型、分化程度、淋巴结转移、临床分期的关系　　MMP-2、MMP-9 阳性表达与 NSCLC 患者的病理类型、分化程度无关($P > 0.05$),而与淋巴结转移、临床分期相关($P < 0.05$, $P < 0.01$),有淋巴结转移组明显高于无淋巴结转移组,并且随着临床分期越晚表达增高(表 1)。

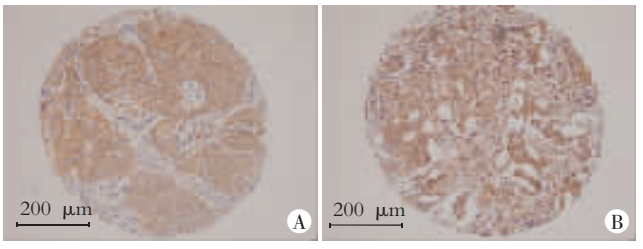
2.2.4　NSCLC 中 MMP-2、MMP-9 表达水平的相关性　　MMP-2、MMP-9 均阳性表达的患者为 58 例,Kappa = 0.716,$P <$

0.001，说明二者表达呈显著正相关关系（表2）。



A：鳞癌；B：腺癌

图2 MMP-2在肿瘤细胞中表达呈强阳性 （S-P）



A：鳞癌；B：腺癌

图3 MMP-9在肿瘤细胞中表达呈阳性 （S-P）

表1 MMP-2，MMP-9的表达水平与NSCLC临床病理特征的关系

临床特征	病例数	MMP-2			MMP-9		
		阳性例数	阳性率（%）	*P*	阳性例数	阳性率（%）	*P*
性别							
男	68	55	80.88	>0.05	50	73.53	>0.05
女	12	10	83.33		9	75.00	
年龄							
≥55岁	41	33	80.48	>0.05	31	75.60	>0.05
<55岁	39	32	82.05		28	71.79	
肿块大小							
≥3 cm	75	61	81.33	>0.05	55	73.33	>0.05
<3 cm	5	4	80.00		4	80.00	
病理类型							
鳞癌	40	30	75.00	>0.05	30	75.00	>0.05
腺癌	40	35	87.50		29	72.50	
分化程度							
高中分化	73	59	80.82	>0.05	53	72.60	>0.05
低分化	7	6	85.71		6	85.71	
淋巴结转移							
有	72	61	84.72	<0.05	56	77.78	<0.05
无	8	4	50.00		3	37.50	
临床分期							
Ⅰ+Ⅱ	28	16	57.14	<0.01	15	53.57	<0.05
Ⅲ	52	49	94.23		44	84.61	

表2 NSCLC中MMP-2、MMP-9表达的相关性

MMP-2	MMP-9		合计
	阳性	阴性	
阳性	58	7	65
阴性	1	14	15
合计	59	21	80

3 讨论

组织芯片技术最早由Kononen等[3]于1998年建立并报道，具有高产出、实验误差小、对原始组织蜡块损坏小、方便经济等优点，现已得到广泛的应用，研究内容包括膀胱移行细胞癌[4]、结直肠癌[5]、肺癌[6,7]、人脑胶质细胞瘤[8]等。本研究共选取80例NSCLC患者标本制作组织芯片，结合免疫组化方法，检测MMP-2及MMP-9在NSCLC中的表达，既省时经济，且实验条件一致，从而保证了结果的稳定、可靠。

近年来的研究表明肺癌的侵袭和转移是一个极其复杂的多阶段、多步骤过程，肺癌转移的发生首先是需要肿瘤细胞能突破细胞外基质及毛细血管基底膜，从而向周围组织侵袭或进入血循环及淋巴系统进而发生转移。其中基质金属蛋白酶是参与这一过程中最重要的蛋白酶，能降解细胞外基质的绝大多数成分，因而MMPs在肿瘤侵袭转移中起重要作用。

MMP-2、MMP-9是MMPs中2个重要的酶，均属明胶酶类，是能够降解Ⅳ型胶原的主要基质水解酶，它们一方面降解、破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质和基底膜，使瘤细胞可沿着缺失的基底膜向周围组织浸润，促进肿瘤侵袭和转移；另一方面可通过毛细血管内生、肿瘤新生血管生成等促进肿瘤生长和扩散[9]。已有在食道癌、胃癌、膀胱癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠癌中都有MMPs的过度表达的文献报道。

本研究结果显示，MMP-2、MMP-9在NSCLC中均有较高阳性表达率，分别为81.25%（65/80）和73.75%（59/80），而既往研究表明MMPs可通过降解细胞外基质、破坏基底膜、促进肿瘤新生血管生成，此与肺癌易于局部浸润及远处转移的生物学行为一致，而且，进一步分析发现，MMP-2、MMP-9的表达水平呈显著正相关，这可能是由于MMPs的活化过程中，MMPs的相互作用广泛存在。目前，有关二者表达相关性的研究较少。

本研究还表明：①MMP-2、MMP-9在NSCLC中的表达与性别、年龄、肿块大小、分化程度无关，此与文献[10]报道一致。②MMP-2和MMP-9的表达与临床病理类型无关，而盛辉等[11]报道MMP-2的表达在肺腺癌组织中明显高于肺鳞癌，周建华等[10]报道MMP-9在肺腺癌中表达显著高于肺鳞癌，薛洋等[12]报道MMP-2、MMP-9在肺腺癌及腺鳞癌中的表达水平均显著低于在肺鳞癌中的表达水平，因此，MMP-2、MMP-9在NSCLC中的表达水平是否与病理类型有关尚需进一步研究。③MMP-2、MMP-9在NSCLC中有淋巴结转移组及临床分期较晚组的阳性表达率显著高于无淋巴结转移组及临床分期较早组，尤以临床分期差异显著（$P<0.01$），结合文献[10,12]，提示它们在NSCLC中

的表达水平与肺癌分期、淋巴结转移有密切关系，这与 MMPs 能降解细胞外基质的绝大多数成分进而影响肿瘤浸润的范围是一致的。本研究结果表明检测肺癌组织 MMP-2、MMP-9 的表达水平可作为临床评估 NSCLC 进展的重要指标之一。

参考文献：

[1] Pritchard S C, Nicolson M C, Lloret C, *et al*. Expression of matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their tissue inhibitors in stage II non-small cell lung cancer: implications for MMP inhibition therapy[J]. Oncol Rep, 2001, 8(2): 421 - 424.

[2] 董　频，李晓艳，路光忠，等. 应用组织芯片探讨纤维连接蛋白和抑癌基因 p53 以及 Ezrin 表达与喉癌生物学行为的关系[J]. 中华耳鼻咽喉科杂志，2004，39（11）：683 - 686.

[3] Kononen J, Bubendortf L, Kallioniemi A, *et al*. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844 - 847.

[4] Visapaa H, Seligson D, Eeva M, *et al*. 8q24 amplification in transitional cell carcinoma of bladder[J]. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2003, 11(1): 33 - 36.

[5] Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, *et al*. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression[J]. Virchows Arch, 2003, 443(2): 115 - 121.

[6] Tan D, Li Q, Deeb G, *et al*. Thyroid transcription factor-1 expression prevalence and its clinical implications in non-small cell lung cancer: a high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry study[J]. Hum Pathol, 2003, 34（6）: 597 - 604.

[7] 李　宁，汪　波，张　星，等. 组织微阵列方法分析晚期非小细胞肺癌患者 HER2 蛋白表达及其临床意义[J]. 中国肺癌杂志，2006，9(1)：51 - 54.

[8] 王清良，卞修武，章　容，等. 人脑星形细胞肿瘤微血管组织芯片的构建[J]. 第三军医大学学报，2006，28(9)：886 - 888.

[9] Nutt J E, Durkan G C, Mellon J K, *et al*. Matrix metalloproteinases (MMPs) in bladder cancer: the induction of MMP9 by epidermal growth factor and its detection in urine[J]. BJU Int, 2003, 91(1): 99 - 104.

[10] 周建华，王文祥，文继舫，等. MMP_2、MMP_9、$TIMP_1$、$TIMP_2$ 在非小细胞肺癌中的表达及临床病理学意义[J]. 实用预防医学，2006，13(1)：23 - 26.

[11] 盛　辉，苑春莉，周洪澜，等，MMP-2 和 TIMP-2 在肺癌组织中的表达及其与微血管密度的关系[J]，吉林大学学报：医学版，2006，32(6)：1059 - 1062.

[12] 薛　洋，周清华，张尚福，等. MMP-2、MMP-9 在肺癌中的表达及其与肺癌转移和预后关系的研究[J]. 华西医学，2008，23(2)：225 - 227.

（编辑　汪勤俭）

文章编号：1000-5404(2009)06-0521-01

个案与短篇

非常规术式经皮球囊二尖瓣成形术 1 例

王红勇，杨成明，王旭升，曾春雨，傅春江，方玉强　（第三军医大学大坪医院野战外科研究所心血管内科，重庆 400042）

1　临床资料

患者，女性，45 岁，因“间歇性心悸、气促 20 年，加重 5 d”以“风心病二尖瓣狭窄”收住入院。既往有“风心病”病史 20 年。入院查体：BP 120/80 mmHg，未见颈静脉充盈，甲状腺不大，双肺（－），心尖部可扪及舒张期细震颤，心率 90 次/min，第一心音拍击样亢进，心尖部闻及舒张中晚期隆隆样递增型杂音，胸骨下段左缘闻及典型开瓣音，肝脾未及，双下肢无浮肿。EKG 提示窦性心律，二尖瓣 P 波；胸片提示右室、左房增大，见双房影；心脏 B 超提示单纯重度二尖瓣狭窄（瓣口面积为 0.7 cm^2），不伴二尖瓣闭锁不全和主动脉瓣狭窄闭锁不全，左房内未见附壁血栓。综合以上病历资料决定行经皮球囊二尖瓣成形术（percutaneous balloon mitral angioplasty, PBMV）。但在 PBMV 中进行球囊测试时发现在向球囊导管远端球囊充盈腔注入稀释造影剂时，球囊膨胀顺序并不是通常的先远端、再近端、后中央（腰部）的顺序，而是先近端、再远端、后中央的顺序。由于手头无其他备用球囊，我们采取了非常规的手术方式，即球囊导入左房后，先充盈膨胀球囊的近端，然后在导向钢丝的帮助下将尚未充盈的球囊远端及腰部导入左室（此时球囊近端位于左房侧且尽量贴紧二尖瓣心房侧），经初步判断确定球囊远端游离于左室腔（未卡在腱索中）后按预定值迅速充盈球囊远端，随后进一步充盈膨胀腰部，此间可见球囊先呈哑铃状（具有典型腰征），随后腰征消失。球囊至预定大小后迅速回抽排空球囊并回退至左房。此时，听诊心尖部舒张期杂音几近消失，未闻及收缩期杂音，左房压力由术前的 37/12（20）mmHg 下降至 12/5（8）mmHg，提示 PBMV 成功。术后经胸超声提示二尖瓣口面积由 0.7 cm^2 增至 1.8 cm^2，且二尖瓣无明显反流，同样显示 PBMV 效果良好。

2　讨论

PBMV 是治疗单纯性二尖瓣狭窄（二尖口面积≤1.5 cm^2）的有效方法，只要适应证选择得当，在一定程度上可以代替外

（下转 525 页）

作者简介：王红勇，男，四川省德阳市人，博士，主任医师，教授，主要从事心血管病介入治疗方面的研究。E-mail：whysir@yahoo.com.cn

收稿日期：2008-12-12；修回日期：2008-12-30