文章编号:1000-5404(2009)19-1859-03

论著

血管内皮生长因子和基质金属蛋白酶-9在前列腺癌中的表达及其相互关系

王钦文[1],刁鑫伟[2],陈正堂[1],叶明福[2],许建平[2],王亚丽[2] (第三军医大学新桥医院:[1]全军肿瘤诊治研究所,[2]病理科,重庆 400037)

摘 要:目的 分析血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)在前列腺癌中的表达及其相互关系。**方法** 应用免疫组织化学方法,检测148例前列腺癌(prostate cancer,PCa)组织中和10例前列腺增生(benign prostatic hyperplasia,BPH)组织中VEGF和MMP-9的表达。**结果** 前列腺癌组织中VEGF和MMP-9的高表达率分别为66.2%、39.2%,显著高于前列腺增生组($P<0.05$)。VEGF和MMP-9的表达与前列腺癌的分化程度及转移有关($P<0.05$),与患者的年龄及雄激素受体水平(AR)无关($P>0.05$)。且VEGF、MMP-9在前列腺癌中的表达具有相关性。**结论** VEGF和MMP-9的表达与前列腺癌的发展密切相关,并对前列腺癌的预后判定有一定的意义。

关键词: 前列腺癌;免疫组织化学;VEGF;MMP-9
中图法分类号: R341; R730.23; R737.25 **文献标识码:** A

Clinical significance of expressions of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in prostate carcinoma

WANG Qin-wen[1], DIAO Xin-wei[2], CHEN Zheng-tang[1], YE Ming-fu[2], XU Jian-ping[2], WANG Ya-li[2] ([1]Cancer Research Center, [2]Department of Pathology, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To explore the relationship between the expressions of vascular endothelial growth factor (VEGF) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in prostate cancer. **Methods** The expression of VEGF and MMP-9 in 148 samples of pathologically verified human prostate cancer (PCa) and 10 samples of benign prostatic hyperplasia (BPH) were detected by immunohistochemical staining. **Results** VEGF was overexpressed in 98 of 148 tumor tissues (66.2%) and MMP-9 was overexpressed in 58 of 148 tumor tissues (39.2%). Both of them were significantly higher than those in BPH ($P<0.05$). The expression of VEGF and MMP-9 was correlated with metastasis and differentiation ($P<0.05$), but it was not related to the androgen receptor (AR) level and the age of patients ($P>0.05$). But the expression of VEGF was correlated with that of MMP-9. **Conclusion** The expressions of VEGF and MMP-9 are closely associated with the development of prostate cancer. Therefore VEGF and MMP-9 may be clinically useful as predictor of patients' survival.

Key words: prostate cancer; immunohistochemical staining; vascular endothelial growth factor; matrix metalloproteinase-9

前列腺癌为泌尿生殖系统最常见的肿瘤之一,随着人类生活水平的提高,其发病率在不断的上升。近年来我国前列腺癌的发病率呈明显上升趋势[1]。前列腺癌的浸润、转移是其恶性标志,也是其治疗的最大障碍和导致患者死亡的主要原因之一。血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor,VEGF)在血管发生过程及维持血管壁的完整性和通透性等方面具有重要作用。在多种肿瘤组织中均有表达。基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9,MMP-9)是基质金属蛋白酶家族中的一种,是细胞外基质降解的主要介质。本实验应用免疫组织化学法检测前列腺癌组织中VEGF和MMP-9在前列腺癌中的表达,探讨与临床病理参数之间的关系及其临床意义。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30500504);第三军医大学科研创新基金(XG200533)
Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (30500504) and the Innovation Foundation of Third Military Medical University (XG200533)
作者简介: 王钦文,女,山东省烟台市人,博士研究生,主要从事肿瘤临床治疗方面的研究。E-mail:08198306@163.com
通信作者: 刁鑫伟,电话:(023)68774697,E-mail: diaoxinwei931@yahoo.com.cn
收稿日期: 2009-01-12;**修回日期:** 2009-02-27

1 材料与方法

1.1 对象

收集第三军医大学新桥医院和大坪医院野战外科研究所1982－2007年手术切除及穿刺确诊前列腺癌标本148例，年龄34～85岁，平均50岁。其中，高分化癌41例，中分化癌51例，低分化癌56例；有转移10例，无转移138例；AR阳性76例，AR阴性72例。患者术前均未接受过放化疗及内分泌治疗。取10例前列腺增生组织标本作为对照。

1.2 试剂

鼠抗人VEGF单克隆抗体（购自福州迈新公司），鼠抗人MMP-9单克隆抗体（购自福州迈新公司），工作浓度为1∶80，S-P免疫组化试剂盒（购自福州迈新公司）。

1.3 方法

采用链霉菌亲生物素-过氧化物酶法（S-P法）。石蜡包埋组织后3 μm连续切片，常规脱蜡水化，H_2O_2甲醇液室温处理20 min，PBS冲洗3×3 min；0.1%胰酶37 ℃孵育30 min，PBS冲洗3×3 min，10%羊血清37 ℃孵育30 min；每张切片滴加第一抗体，4 ℃冰箱过夜，PBS冲洗3×3 min；联苯二胺（DAB）显色，苏木精复染，脱水，封片。PBS代替一抗作为阴性对照。VEGF阳性对照为毛细血管瘤标本，MMP-9阳性对照为乳腺浸润性导管癌标本。

1.4 结果判定

细胞质染色为棕色或棕褐色为VEGF和MMP-9阳性表达细胞。以阳性细胞所占比例分级。（－）：为阴性表达；（＋）：阳性细胞数占10%～25%，呈浅棕色；（＋＋）：阳性细胞数占25%～50%，呈棕色；（＋＋＋）：阳性细胞数占50%以上，呈褐色。

1.5 统计学处理

VEGF和MMP-9值以 $\bar{x} \pm s$ 表示，应用SPSS 13.0统计软件进行 χ^2 检验。VEGF蛋白与MMP-9蛋白表达的相关性采用相关分析。

2 结果

2.1 VEGF和MMP-9在前列腺癌、前列腺增生组织中的表达

VEGF标记主要见于前列腺癌良、恶性增生上皮细胞、正常上皮细胞及血管内皮细胞，间质中偶见其他弱阳性表达细胞（图1A）。10例BPH中9例有VEGF表达，呈弱阳性，148例前列腺癌中，VEGF全部呈阳性表达，且高表达率为66.2%；MMP-9蛋白阳性表达部位主要在细胞质，正常前列腺上皮及BPH组增生腺上皮MMP-9呈弱阳性（图1B），而在148例前列腺癌中有132例呈阳性表达，高表达率为39.2%（表1）。

2.2 VEGF和MMP-9的表达与临床病理因素的分析

VEGF和MMP-9蛋白的高表达率在转移组显著高于无转移组，差异有显著性（$P<0.05$）；在高分化组的高表达率分别为12.19%、7.32%；在中分化组的高表达率分别为76.47%、27.45%；在低分化组的高表达率分别为96.43%、73.21%，经统计学处理，3组有显著性差异（$P<0.05$）。但是，VEGF和MMP-9的表达均与前列腺癌患者的年龄及AR水平无关（$P>0.05$）（表2）。

2.3 VEGF的表达与MMP-9表达的关系

在148例前列腺癌中，VEGF和MMP-9表达同为弱阳性者为32例，同为阳性者为22例，同为强阳性者为9例。由表3可知，VEGF与MMP-9在前列腺癌组织中的表达有相关性（$\chi^2=65.107$，$P=0.000$）。

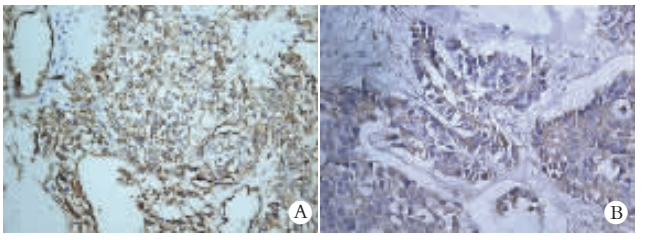


图1 VEGF（A）和MMP-9（B）在前列腺癌组织中的表达 （S-P×400）

表1 不同组别VEGF和MMP-9的表达

组别	例数	VEGF -	+	++	+++	高表达率（%）	P值	MMP-9 -	+	++	+++	高表达率（%）	P值
BPH组	10	1	9	0	0	0	<0.05	5	4	1	0	10	<0.05
PCa组	148	0	50	64	34	66.2		16	74	47	11	39.2	

表2 前列腺癌组织中VEGF和MMP-9的表达与临床病理因素的关系

因素	例数	VEGF -	+	++	+++	高表达率（%）	P值	MMP-9 -	+	++	+++	高表达率（%）	P值
病理分级													
高分化	41	0	36	4	1	12.19		13	25	2	1	7.32	
中分化	51	0	12	31	8	76.47	P<0.05	2	35	12	2	27.45	P<0.05
低分化	56	0	2	29	25	96.43		1	14	33	8	73.21	
年龄													
≥65岁	59	0	16	30	13	72.88	P>0.05	5	30	21	3	40.68	P>0.05
<65岁	89	0	34	34	21	61.79		11	44	26	8	38.21	
有无转移													
有	10	0	0	1	9	100.00	P<0.05	0	0	5	5	100.00	P<0.05
无	138	0	53	63	23	62.32		16	74	42	6	34.78	
AR													
阳性	76	0	34	28	14	55.26	P>0.05	11	44	16	5	27.63	P>0.05
阴性	72	0	16	36	20	77.78		5	30	31	6	51.39	

表3 VEGF与MMP-9表达的关系

VEGF	MMP-9 -	+	++	+++
+	13	32	5	0
++	3	37	22	2
+++	0	5	20	9

3 讨论

肿瘤的发生、发展是多种因素参与、多步骤的复杂过程。转移和浸润是恶性肿瘤最重要的生物学特征，但其机制目前尚不完全清楚。前列腺癌的生长和远处转移与血管形成、肿瘤细胞及细胞外基质的相互作用有密切关系。前列腺癌的演进被认为是通过肿瘤细胞来诱导血管发生的[2]。新生血管不仅为肿瘤的生长

提供营养,还可为肿瘤细胞的转移提供通道。VEGF 是目前所知主要的血管内皮生长因子,它在促进肿瘤血管内皮细胞增殖和增加血管通透性方面起着重要的作用。研究发现 VEGF 的表达与前列腺癌淋巴结转移及 Gleason 评分密切相关[3]。VEGF 在前列腺癌的形成及转移中起着重要的作用[4]。Lekas 等[5]研究发现,在前列腺癌组织中 VEGF 的表达明显高于前列腺增生组织。本实验结果显示 VEGF 在 Pca 组中的高表达率为 66.2%(98/148),明显高于 BPH 组(0/10);VEGF 与前列腺癌的病理分级密切相关;远处转移组中 VEGF 表达明显高于无转移组($P<0.05$),但在年龄及 AR 水平的分组中均无统计学意义($P>0.05$)。这提示我们,VEGF 在前列腺癌中的表达与病理分级、远处转移相关,说明 VEGF 可能参与了前列腺癌的远处转移,可能成为前列腺癌预后的一个重要指标。

基质金属蛋白酶(MMPs)在肿瘤的浸润中起重要作用[6]。MMP-9 是降解 IV 型胶原最主要的酶,与肿瘤的浸润及转移有关。MMP-9 的主要作用是在生理 pH 值和金属锌离子作用下,参与细胞外基质的降解与重建。突破基底膜是肿瘤细胞进行浸润及转移的最初和最关键阶段,而基底膜正是 MMP-9 的主要底物。研究发现[7],CXCL12 通过前列腺癌细胞诱导 MMP-9 的表达。同时,抑制 PI3 激酶和 MAPK 激酶通路能够阻止 CXCL12 诱导 MMP-9 的表达和侵袭。Chinni 等[8]将前列腺癌细胞 PC-3 注入胎儿的骨值入体中,发现 PC-3 细胞移行是从骨髓到骨小梁的骨内膜表面;同时发现用 SDF-1 处理过的 PC-3 细胞能够促进 MMP-9 的分泌。本研究显示,Pca 组 MMP-9 的高表达率明显高于 BPH 组,说明 MMP-9 可能参与了前列腺癌的发生和发展,MMP-9 的表达与前列腺癌的病理分级和远处转移密切相关($P<0.05$);但与患者的年龄及 AR 水平无关($P>0.05$),提示 MMP-9 可能促进了前列腺癌的远处转移。

VEGF 和 MMP-9 是重要的促血管生成和转移的分子,他们启动子区域包含 NF-KappaB 和 AP-1 结合位点,NF-KappaB 和 AP-1 在前列腺癌的发生、发展中起重要作用[9]。在乳腺癌的研究中发现[10],VEGF 和 MMP-9 同原发肿瘤的分期、组织学分级和淋巴结转移有密切的联系;VEGF 和 MMP-9 同时高表达与淋巴结转移的密切程度要高于 2 个指标中的任何一个单独指标。Tamura 等[11]用 ELISA 方法检测了非小细胞肺癌患者和原发性肝癌患 VEGF 和 MMP-9 的表达水平,发现转移组 VEGF 和 MMP-9 的表达高于无转移组[12]。我们研究发现,在前列腺癌转移组 VEGF、MMP-9 的高表达率高于无转移组($P<0.05$),而且 VEGF 和 MMP-9 之间的表达呈正相关,说明两者可能在前列腺癌的远处转移中起协同作用。由于肿瘤的转移是影响患者预后的独立因素,VEGF、MMP-9 表达增高常提示患者预后较差,因此,VEGF、MMP-9 抑制剂的研究将为前列腺癌的治疗开辟新的途径。

参考文献:

[1] Peyromaure M, Debre B, Mao K, *et al*. Management of prostate cancer in China: a multicenter report of 6 institutions[J]. J Urol, 2005, 174(5): 1794 - 1797.

[2] Kong D, Li Y, Wang Z, *et al*. Inhibition of angiogenesis and invasion by 3,3′-diindolylmethane is mediated by the nuclear factor-KappaB downstream target genes MMP-9 and uPA that regulated bioavailability of vascular endothelial growth factor in prostate cancer[J]. Cancer Res, 2007, 67(7): 3310 - 3319.

[3] El-Gohary Y M, Sliverman J F, Olson P R, *et al*. Endoglin (CD105) and vascular endothelial growth factor as prognostic markers in prostatic adenocarcinoma[J]. Am J Clin Pathol, 2007, 127(4): 572 - 579.

[4] Fukuda H, Tsuchiya N, Narita S, *et al*. Clinical implication of vascular endothelial growth factor T - 460C polymorphism in the risk and progression of prostate cancer[J]. Oncol Rep, 2007, 18(5): 1155 - 1163.

[5] Lekas A, Lazaris A C, Deliveliotis C, *et al*. The expression of hypoxia-inducible factor-1alpha (HIF-1alpha) and angiogenesis markers in hyperplastic and malignant prostate tissue[J]. Anticancer Res, 2006, 26(4B): 2989 - 2993.

[6] Herszenyi L, Sipos F, Galamb O, *et al*. Matrix metalloproteinase-9 expression in the normal mucosa-adenoma-dysplasia-adenocarcinoma sequence of the colon[J]. Pathol Oncol Res, 2008, 14(1): 31 - 37.

[7] Chinni S R, Sivalogan S, Dong Z, *et al*. CXCL12/CXCR4 signaling activates Akt-1 and MMP-9 expression in prostate cancer cells: the role of bone microenvironment-associated CXCL12[J]. Prostate, 2006, 66(1): 32 - 48.

[8] Chinni S R, Deng X, Dong Z, *et al*. The role of SDF-1alpha/CXCR4/MMP-9 in prostate cancer bone metastasis[J]. Clin Exp Metastasis, 2002, 19(1): 40 - 52.

[9] Uzzo R G, Crispen P L, Golovine K, *et al*. Diverse effects of zinc on NF-KappaB and AP-1 transcription factors: implications for prostate cancer progression[J]. Carcinogenesis, 2006, 27(10): 1980 - 1990.

[10] Hao L, Zhang C, Qiu Y, *et al*. Recombination of CXCR4, VEGF, and MMP-9 predicting lymph node metastasis in human breast cancer[J]. Cancer Lett, 2007, 253(1): 34 - 42.

[11] Tamura M, Oda M, Matsumoto I, *et al*. The combination assay with circulating vascular endothelial growth factor (VEGF)-C, matrix metalloproteinase-9, and VEGF for diagnosing lymph node metastasis in patients with non-small cell lung cancer[J]. Ann surg Oncol, 2004, 11(10): 928 - 933.

[12] Kamel L, Nessim I, Abd-el-Hady A, *et al*. Assessment of the clinical significance of serum vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-9 in patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Egypt Soc Parasitol, 2005, 35(3): 875 - 890.

(编辑　龙　亮)