论著

文章编号:1000-5404(2010)24-2632-04

胃癌组织中CEACAM6、MMP-9的表达及其与临床病理的关系

潘海邦[1,2],王 波[2],杨爱军[3],关泉林[1] (730000 兰州,兰州大学:第一医院肿瘤外科[1],病理教研室[3];730000 兰州,甘肃中医学院临床医学系[2])

【摘要】 **目的** 探讨CEACAM6、MMP-9在胃癌组织中的表达及其与微血管生成之间的关系。**方法** 免疫组化法分别检测CEACAM6、MMP-9在54例胃癌组织及10例胃正常组织中的表达情况及与微血管密度(microvessel density,MVD)表达的相关性。**结果** CEACAM6、MMP-9在胃癌组织中表达率分别为85.19%(46/54)、74.7%(40/54),明显高于胃正常组织中表达率30%(3/10)、20%(2/10),胃癌组织中MVD值(32.17±8.97)明显高于胃正常组织[(18.62±5.07),$P<0.05$)]。胃癌组织中CEACAM6与性别、年龄、分化程度和淋巴结转移无关($P>0.05$);而与浸润深度、临床分期有关($P<0.05$)。MMP-9和MVD与性别、年龄无关($P>0.05$);而与浸润深度、临床分期、分化程度及淋巴结转移有关($P<0.05$);CEACAM6与MMP-9在胃癌组织中的表达呈正相关($r=0.593$,$P=0.000$);CEACAM6、MMP-9阳性表达的MVD明显高于相应阴性表达($P<0.05$)。**结论** CEACAM6、MMP-9在胃癌组织中高表达,可能参与了胃癌的发生、发展,与胃癌微血管生成和浸润、转移有关。

【关键词】 胃癌;CEACAM6;MMP-9;微血管密度;免疫组化
【中图法分类号】 R730.23;R730.43;R735.2 【文献标志码】 A

Expressions of CEACAM6 and MMP-9 in gastric carcinoma and their relationship with clinicopathological features: report of 54 cases

Pan Haibang[1,2], Wang Bo[2], Yang Aijun[3], Guan Quanlin[1] ([1]Department of Oncological Surgery, First Hospital, [3]Department of Pathology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu Province, 730000; [2]Faculty of Clinical Medicine, Gansu Traditional Chinese Medicine College, Lanzhou, Gansu Province, 730000, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the expressions of CEACAM6 (CD66c) and MMP-9 in gastric cancer tissue and their relationship with tumor micro-angiogenesis. **Methods** Immunohistochemistry was used to detect the expressions of CEACAM6 and MMP-9, and microvessel density (MVD) in 54 samples of gastric cancer and 10 normal gastric tissue. The clinical data were retrospectively analyzed. **Results** The positive rates of CEACAM6 and MMP-9 in gastric carcinoma tissue were 85.19% (46/54) and 74.7% (40/54), respectively, which were significantly higher than those in normal gastric tissue [30.00% (3/10), 20.00% (2/10), respectively, $P<0.05$]. The value of MVD in gastric cancer tissue was 32.17±8.97, which was significantly higher than that in normal gastric tissue (18.62±5.07, $P<0.05$). The expression of CEACAM6 was associated significantly with depth of invasion and clinical stage of gastric cancer ($P<0.05$), but was not associated with gender, age, differentiation and lymph node metastasis ($P>0.05$). The expression of MMP-9 and the value of MVD were associated significantly with depth of invasion, clinical stage, differentiation and lymph node metastasis of gastric cancer ($P<0.05$), but they had no relation with gender and age ($P>0.05$). There was a significantly positive correlation between CEACAM6 expression and MMP-9 expression in gastric cancer tissue ($r=0.593$, $P=0.000$). The value of MVD in the individuals with positive expression of CEACAM6 or MMP-9 was significantly higher than that in the patients negative to CEACAM6 or MMP-9 ($P<0.05$). **Conclusion** Moderate and strong expressions of MMP-9 and CEACAM6 in gastric cancer tissue are associated with tumor micro-angiogenesis, invasion and metastasis, which may contribute to the occurrence and development of gastric cancer.

【**Key words**】 gastric cancer; CEACAM6; MMP-9; microvessel density; immunohistochemistry

Corresponding author: Guan Quanlin, E-mail: guanquanlin2010@163.com

【通信作者】 关泉林,E-mai:guanquanlin2010@163.com

胃癌在全世界范围内是发病率较高的恶性肿瘤之一，我国胃癌的患病率和病死率均已超过世界平均水平的2倍，严重威胁人类健康。大量的实验研究表明，胃癌的发生、发展是一个多基因变异所致的病变过程[1]，因此，对肿瘤相关基因的研究将有可能成为攻克胃癌的突破口。CEACAM6又名CD66c，是癌胚抗原相关细胞黏附分子，已有部分研究证实CEACAM6与乳腺癌[2]、结直肠癌[3]、肝胆管癌[4]及胰腺癌[5]等的进展、预后以及治疗干预有一定的相关性。目前有关CEACAM6在胃癌组织中表达与临床关系的研究还少见报道。本实验采用免疫组织化学法，检测胃癌及胃正常黏膜组织中CEACAM6和MMP-9在胃癌组织中的表达情况及与微血管密度(microvessel density，MVD)表达的相关性，探讨它们在胃癌组织中的可能作用及意义。

1 资料与方法

1.1 标本来源

收集2007年1月至2009年11月兰州大学第一医院肿瘤外科常规病理学检查证实的原发性胃癌患者标本54例，患者中男性32例，女性22例；年龄39～76(54.48±11.43)岁，其中年龄≥60岁14例，<60岁40例。依据国际抗癌联盟(UICC)1987年公布的胃癌TNM分期标准进行分期，其中Ⅰ期14例，Ⅱ期10例，Ⅲ期22例，Ⅳ期8例。按病理形态学分：腺癌44例，印戒细胞癌10例；按部位分：胃窦癌32例，胃体癌6例，贲门胃底癌10例，弥漫浸润癌(全胃癌)6例；按肿瘤细胞分化程度分：高分化癌12例，中分化癌14例，低分化癌和印戒细胞癌28例；按有无淋巴转移分：无淋巴转移24例，有淋巴转移30例，包括4例肝转移癌。所有病例术前未接受放、化疗及免疫治疗。10例正常胃组织来源于兰州大学第一医院病理科胃活检组织，并经病理诊断为正常胃组织标本。病理诊断由本院病理科专家复诊。

1.2 主要试剂

浓缩型鼠抗人单克隆抗体CEACAM6购英国Abcam公司，稀释浓度为1∶100；兔抗人MPP-9、兔抗人Anti-factor Ⅷ单克隆抗体、PV9000试剂盒、DAB显色剂均购自北京博奥森生物技术有限公司，稀释浓度均为1∶100。

1.3 检测方法

采用免疫组织化学Elivison二步法，所有标本均经10%甲醛固定，石蜡包埋，连续4～5 μm切片，预实验探索最佳稀释浓度，切片常规脱蜡、脱水，采用3%过氧化酶阻断溶液，室温孵育10 min，微波炉中抗原修复，一抗4 ℃过夜，二抗温箱孵育10 min，DAB显色，苏木精复染，脱水，透明，封片。每次实验用已知阳性片作阳性对照，用PBS代替一抗作阴性对照，操作均严格按试剂盒使用说明书进行。

1.4 阳性结果判断标准

参照Shimizu等[6-7]方法，进行半定量分级，至少观察10个高倍视野，根据着色强度及阳性细胞比例打分。①根据着色强度进行评分：基本不着色0分，黄色1分，棕黄色2分，棕褐色3分；②阳性细胞比例：≤10%为0，11%～25%为1，26%～50%为2，51%～75%为3，>75%为4。将2项积分相乘：0分为－，1～4分为＋，5～8分为＋＋，9～12分为＋＋＋；＋为低表达，＋＋、＋＋＋为高表达。Anti-factor Ⅷ标记后显微镜下计数MVD，参照Weidner法[8]，先在低倍视野(×100倍)光学镜下全面观察切片，确定肿瘤间质内新生血管密度，密度最高处即新生血管形成的活跃区。在高倍视野(×200倍)下，每张切片随机观察计数5个视野的肿瘤血管，然后求其平均值作为肿瘤的MVD，管径>8个红细胞直径的血管不计在其内。

1.5 统计学方法

数据均在SPSS 13.0统计软件下分析，计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 t 检验或单因素方差分析，计数资料采用 χ^2 检验，Sperman秩和检验分析各指标间的相关性。

2 结果

2.1 CEACAM6与MMP-9在胃癌组织及胃正常组织中的阳性表达

CEACAM6阳性颗粒主要位于细胞质及细胞膜上，MMP-9阳性颗粒主要见于细胞质中，两者在胃癌组织中的阳性表达率分别为85.19%(46/54)、74.7%(40/54)，均高于胃正常组织30%(3/10)、20%(2/10)；胃癌组织中MVD值(32.17±8.97)明显高于胃正常组织中MVD值(18.62±5.07，$P<0.05$)。见图1。

2.2 CEACAM6、MMP-9在胃癌组织中的表达和MVD与临床病理之间的关系

表1结果显示，胃癌组织中CEACAM6表达与性别、年龄、组织类型、癌组织的分化程度和有无淋巴结转移无关($P>0.05$)；而与浸润深度、临床分期明显相关($P<0.05$)。MMP-9表达和MVD值与性别、组织类型、年龄无相关性($P>0.05$)；与癌组织的分化程度、有无淋巴结转移、浸润深度和临床分期有关($P<0.05$)。胃癌组织中的MVD值与癌组织的分化程度、有无淋巴结转移、浸润深度和临床分期有关($P<0.05$)，但与性别、年龄无关($P>0.05$)。

2.3 胃癌组织中CEACAM6与MMP-9表达的相关性

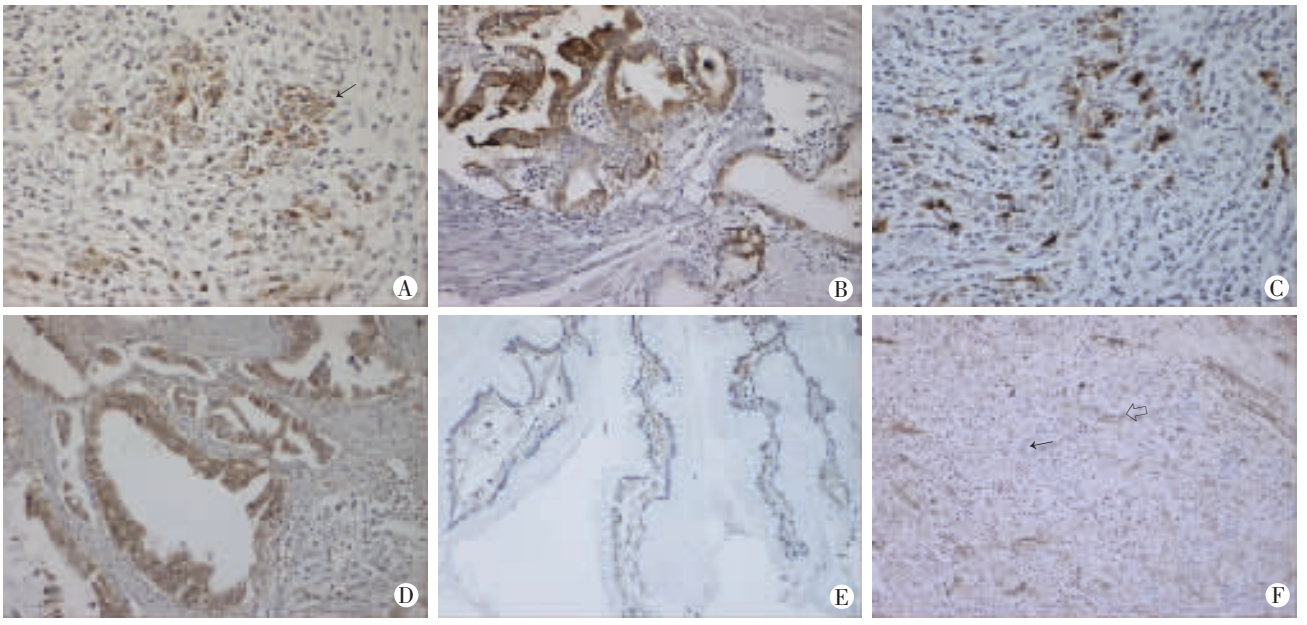
CEACAM6与MMP-9在胃癌组织的表达呈正相关($r=0.593$，$P=0.000$)。

2.4 胃癌组织中CEACAM6、MMP-9与MVD计数的关系

CEACAM6阳性表达的MVD值(36.61±8.85)和MMP-9阳性表达的MVD值(33.16±9.50)均明显高于其阴性表达的MVD值(19.12±2.015，19.56±1.80，$P<0.05$)；且CEACAM6和MMP-9均为阳性表达的患者，其胃癌组织MVD值(33.16±9.50)高于CEACAM6和MMP-9均为阴性表达的患者(19.12±2.015)，也高于CEACAM6阳性表达、MMP-9阴性表达的患者(20.10±0.93)，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

CEACAM6又名CD66c，是癌胚抗原相关细胞黏附分子，为免疫球蛋白超家族中一个分支之一，属于细



A:CEACAM6 胃低分化癌中阳性表达(×400)　↑:癌细胞;B:CEACAM6 高分化腺癌中阳性表达(×200);C:MMP-9 胃低分化癌中阳性表达(×400);D:MMP-9 胃高分化癌中阳性表达(×400);E:MMP-9 胃正常黏膜阳性表达(×200);F:Anti-factor Ⅷ标记的胃癌血管(×400)　↑:癌细胞;⇦:血管

图1　免疫组化检测 CEACAM6 与 MMP-9 在胃癌组织及胃正常组织中的表达　(Elivison 二步法)

表1　胃癌组织 CEACAM6,MMP-9 的表达和 MVD 与临床病理之间的关系

病理因素	*n*	CEACAM6			MMP-9			MVD		
		阳性率(%)	χ^2	*P*	阳性率(%)	χ^2	*P*	阳性率(%)	*t*	*P*
性别			0.035	0.851		0.035	0.851		0.586	0.563
男性	32	28(87.50)			24(85.19)			30.70±9.35		
女性	22	18(81.82)			16(72.73)			32.92±9.85		
年龄(岁)			0.898	0.343		1.256	0.262		1.610	0.121
<60	38	34(89.47)			26(68.42)			34.06±8.99		
≥60	16	12(75.00)			14(87.50)			27.79±9.31		
分化			1.597	0.206		10.683	0.001		2.168	0.040
高中分化	26	20(76.92)			14(53.85)			27.60±7.54		
低分化	28	26(92.86)			26(92.862)			35.11±9.75		
组织类型			0.937	0.333		2.798	0.094		13.75	0.000
腺癌	44	36(81.82)			30(68.18)			31.33±9.69		
印戒癌	10	10(100)			10(100)			39.11±6.98		
浸润深度			15.43	0.000		20.262	0.000		2.118	0.045
T1+T2	18	10(55.56)			6(33.33)			26.13± 8.0		
T3+T4	36	36(100)			34(94.44)			34.09±9.15		
淋巴结转移			2.247	0.134		5.574	0.018		4.671	0.000
−	24	18(75.00)			14(58.33)			24.19±5.64		
+	30	28(93.33)			26(86.67)			37.11±7.78		
分期			9.246	0.002		13.037	0.000		4.096	0.000
Ⅰ~Ⅱ	24	16(66.67)			12(50.00)			24.71±6.15		
Ⅲ~Ⅳ	30	30(100)			28(93.33)			36.73±8.16		

胞表面糖蛋白,通过糖基磷脂酰肌醇连接在细胞膜上[8]。它参与多种恶性肿瘤的发生和进展;在胃、乳腺、胰腺、结直肠等肿瘤中都有过表达,与肿瘤生物学行为和预后密切相关[9]。CEACAM6 的失巢凋亡依赖与 CEACAM6 表达增加有关,CEACAM6 特定的小干扰 RNA(siRNA),提高 Caspase 介导的失巢凋亡的敏感性,抑制 Akt 的磷酸化,可使肿瘤细胞避免失巢凋亡,促使肿瘤的发生和转移[10];CEACAM6 基因沉默逆转已有凋亡依赖,抑制胰腺癌细胞在体内转移能力,认为 CEACAM6 值得进一步研究作为一种新的用于胰腺癌治疗靶点[11]。特异小干扰 RNA(siRNA)抗 CEACAM6 治疗,可通过下调细胞增殖指数,破坏血管生成和增加移植瘤肿瘤细胞凋亡,完全抑制鼠胰腺移植瘤的转移,显著提高移植瘤鼠存活率[12]。

本实验表明CEACAM6在胃癌组织中的表达高于胃正常组织。CEACAM6在胃癌组织中的表达与性别、年龄、肿瘤分化程度、淋巴结转移无明显相关性，这与蔡永杰、陈冬珍等[13-14]在卵巢癌中及国内外学者在乳腺、结肠、胰腺等肿瘤中的研究结果一致。在临床病理分析中发现CEACAM6的表达与浸润深度、临床分期明显相关($P<0.05$)，提示CEACAM6在胃癌的发生、发展中起重要作用；CEACAM6在低分化癌(包括印戒细胞癌)中阳性表达为92.86%(26/28)，高、中分化癌阳性表达为76.92%(20/26)，差异无统计学意义($P=0.206$)；这与Blumenthal等[5]在胰腺癌中研究结果一致。在淋巴结转移阳性组CEACAM6表达率93.33%(28/30)，阴性组75.00%(18/24)，2组比较无统计学意义($P=0.134$)，分析可能与不同肿瘤组织的差异性及病例数较少有关，需在今后的实验中进一步探讨。

基质金属蛋白酶(MMPs)是能降解基质的蛋白水解酶中较重要的一类。MMP-9又称为Ⅳ型胶原酶或明胶酶B，属于明胶酶类，其底物可促进癌细胞对周围组织的浸润，在肿瘤的浸润、转移及血管的生成中发挥重要的作用。MMP-9具有调节微环境及血管生长的作用，血管发生极大的依赖于基质金属蛋白酶的活性，肿瘤新生血管的生长也可为基质金属蛋白酶抑制剂所抑制[15]。Riedel等[16]发现MMP-9在肿瘤的发生、发展可能与VEGF起协同作用。本研究发现，胃癌中MMP-9呈高表达，且与胃癌的分化、浸润、转移、临床分期均密切相关，提示MMP-9与胃癌的浸润、转移、预后有密切关系。

本研究结果显示，胃癌组织中CEACAM6与MMP-9均高表达，且呈正相关($r=0.593$，$P=0.000$)，提示CEACAM6和MMP-9表达间可能有着内在的联系，可能共同参与了胃癌的发生和发展；MVD是反映肿瘤组织血管生成情况的一项客观指标[17]，MVD在CEACAM6和MMP-9阳性表达明显高于阴性表达，在CEACAM6和MMP-9均阳性表达明显高于两者均阴性表达，提示CEACAM6与MMP-9高表达可能与胃癌的恶性生物学行为密切相关。两者可能共同参与肿瘤血管生成、浸润和转移。MVD值在CEACAM6阳性表达、MMP-9阴性表达明显低于CEACAM6和MMP-9均阳性表达，但与两者均阴性表达相比，差异无统计学意义，提示MMP-9与胃癌微血管的形成关系更为密切。随着对CEACAM6和MMP-9研究的深入，CEACAM6和MMP-9可能成为胃癌分子治疗的靶点，其功能作用的某个环节可能成为胃癌分子治疗的突破口。抑制CEACAM6活性可能对胃癌患者的防治有重要意义。对CEACAM6进一步探讨，可能为胃癌的诊断、治疗和预后评价提供重要帮助。

参考文献：

[1] Chalmers J. The 1999 WHO-ISH Guidelines for the Management of Hypertension[J]. Med J Aust, 1999, 171(9): 458-459.
[2] Poola I, Shokrani B, Bhatnagar R, *et al*. Expression of carcinoembryonic antigen cell adhesion molecule 6 oncoprotein in atypical ductal hyperplastic tissues is associated with the development of invasive breast cancer[J]. Clin Cancer Res, 2006, 12(15): 4773-4783.
[3] Jantscheff P, Terracciano L, Lowy A, *et al*. Expression of CEACAM6 in resectable colorectal cancer: a factor of independent prognostic significance[J]. J Clin Oncol, 2003, 21(19): 3638-3646.
[4] Ieta K, Tanaka F, Utsunomiya T, *et al*. CEACAM6 gene expression in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Br J Cancer, 2006, 95(4): 532-540.
[5] Blumenthal R D, Hansen H J, Goldenberg D M. Inhibition of adhesion, invasion, and metastasis by antibodies targeting CEACAM6 (NCA-90) and CEACAM5 (Carcinoembryonic Antigen)[J]. Cancer Res, 2005, 65(19): 8809-8817.
[6] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues[J]. Hum Pathol, 1990, 21(6): 607-612.
[7] 许良中，杨文涛. 免疫组织化学反应结果的判断标准[J]. 中国癌症杂志，1996，6(4)：229-231.
[8] Weidner N. Current pathologic methods for measuring intratumoral microvessel density within breast carcinoma and other solid tumors[J]. Breast Cancer Res Treat, 1995, 36(2): 169-180.
[9] Duxbury M S, Ito H, Zinner M J, *et al*. CEACAM6 gene silencing impairs anoikis resistance and in vivo metastatic ability of pancreatic adenocarcinoma cells[J]. Oncogene, 2004, 23(2): 465-473.
[10] Ordonez C, Screaton R A, Ilantzis C, *et al*. Human carcinoembryonic antigen functions as a general inhibitor of anoikis[J]. Cancer Res, 2000, 60(13): 3419-3424.
[11] Duxbury M S, Matros E, Ito H, *et al*. Systemic siRNA-mediated gene silencing: a new approach to targeted therapy of cancer[J]. Ann Surg, 2004, 240(4): 667-674.
[12] Strickland L A, Ross J, Williams S, *et al*. Preclinical evaluation of carcinoembryonic cell adhesion molecule (CEACAM) 6 as potential therapy target for pancreatic adenocarcinoma[J]. J Pathol, 2009, 218(3): 380-390.
[13] 蔡永杰，赵兴波，李明江，等. CEACAM6在卵巢癌中的表达及临床意义[J]. 中国医药导报，2009，6(9)：25-26.
[14] 陈冬珍，林志红. CEACAM6在卵巢粘液性肿瘤中的表达及其诊断意义[J]. 井冈山学院学报：自然科学版，2009，30(4)：70-72.
[15] Seandel M, Noack-Kunnmann K, Zhu D, *et al*. Growth factor-induced angiogenesis *in vivo* requires specific cleavage of fibrillar type I collagen[J]. Blood, 2001, 97(8): 2323-2332.
[16] Riedel F, Gotte K, Schwalb J, *et al*. Expression of 92-kDa type IV collagenase correlates with angiogenic markers and poor survival in head and neck squamous cell carcinoma[J]. Int J Oncol, 2000, 17(6): 1099-1105.
[17] Fontanini G, Bigni D, Vignati S, *et al*. Microvessel count predicts metastatic disease and survival in non-small cell lung cancer[J]. J Pathol, 1995, 177(1): 57-63.

(收稿 2010-07-18 修回 2010-09-10)
(编辑 张 维)