论著

文章编号:1000-5404(2012)10-1002-04

组织蛋白酶D和基质金属蛋白酶-9在皮肤恶性黑色素瘤中的表达

张 娟,陈旻静,王大伟,刘林嶓,王喜梅,郭丽丽,王 琰 (450052 郑州,郑州大学第一附属医院整形外科)

[摘要] **目的** 检测 Cath-D 和 MMP-9 和在皮肤恶性黑色素瘤、交界痣及正常皮肤中表达情况,及其与皮肤恶性黑色素瘤的临床分期,淋巴结转移的关系。**方法** 应用免疫组化 S-P 法对分别检测 Cath-D 和 MMP-9 在 44 例皮肤恶性黑色素瘤、22 例皮肤交界痣及 20 例正常皮肤中的表达水平。**结果** Cath-D 和 MMP-9 在皮肤恶性黑色素瘤中的阳性表达率(79.55% 和 75.00%)均高于交界痣(45.45% 和 40.91%)及正常皮肤组织(15.00% 和 30.00%)($P<0.05$),Cath-D 和 MMP-9 在皮肤恶性黑色素瘤中的阳性表达率随肿瘤浸润深度的增加而增高,且有淋巴结转移者阳性表达率大于无淋巴结转移者($P<0.05$)。皮肤恶性黑色素瘤中 Cath-D 和 MMP-9 的表达呈正相关($r_s=0.488$, $P<0.05$)。**结论** Cath-D 和 MMP-9 在皮肤恶性黑色素瘤的发生、发展中可能起着重要作用,且与 CMM 的浸润转移密切相关,且二者之间可能具有协同作用。联合检测两者的表达情况可为 CMM 的早期诊断及预后提供新的靶点。

[关键词] 皮肤恶性黑色素瘤;组织蛋白酶 D;基质金属蛋白酶-9;浸润转移

[中图法分类号] R345;R446.6;R739.5 [文献标志码] A

Expression of Cath-D and MMP-9 in cutaneous malignant melanoma

Zhang Juan, Chen Minjing, Wang Dawei, Liu Linbo, Wang Ximei, Guo Lili, Wang Yan (Department of Plastic Surgery, First Affiliated Hospital, Zhengzhou University, Zhengzhou, Henan Province, 450052, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression of cathepsin D (cath-D) and matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in cutaneous malignant melanoma (CMM), junctional nevus and normal skin, and its relationship with the clinical stages and lymph node metastasis of CMM. **Methods** The expression of Cath-D and MMP-9 was detected in 44 cases of CMM, 22 cases of junctional nevus and 20 cases of normal skin specimens by SP immunohistochemical method. **Results** The positive expression rates of Cath-D and MMP-9 in the CMM (79.55% and 75.00%) were higher than those in the junctional nevus (45.45% and 40.91%) and normal skin (15.00% and 30.00%) ($P<0.05$). The positive expression rates of Cath-D and MMP-9 in the CMM increased along with the increase in the depth of tumor invasion, and higher positive expression rates of Cath-D and MMP-9 were detected in the CMM patients with lymph node metastasis than in those without lymph node metastasis. There was a positive correlation between Cath-D and MMP-9 expression in the CMM tissues ($r_s=0.488$, $P<0.05$). **Conclusion** Cath-D and MMP-9 are important in the tumorigenesis and development of CMM and are closely related to CMM invasion and metastasis, with a possible synergistic effect. Combined detection of Cath-D and MMP-9 expression may help both early diagnosis and prognosis of CMM.

[**Key words**] cutaneous malignant melanoma; Cath-D; MMP-9; infiltration metastasis

Corresponding author: Chen Minjing, E-mai: chenmj67@yahoo.com.cn

皮肤恶性黑色素瘤(cutaneous malignant melanoma, CMM)是一种起源于表皮正常黑素细胞的高度恶性的肿瘤,其发展迅速,预后差,死亡率高。侵袭和转移是其重要生物学行为之一。肿瘤细胞向周围组织浸润,并侵入血管和淋巴管等向远处转移,须具备降解细胞外基质的能力。组织蛋白酶-D(cathepsin-D, Cath-D)是一种蛋白水解酶,能溶解细胞外基质及基底膜和结缔组织,为肿瘤浸润、扩散、转移创造条件。近年来,Cath-D 的结构与功能受到重视,而且研究表明 Cath-D 的高表达与肿瘤预后有密切关系[1]。基质金属蛋白酶类(matrix metalloproteinases, MMPs)是一类与肿瘤发生、侵袭密切相关的蛋白水解酶,MMP-9 是 MMPs 家族的重要成员,能有效的降解细胞外基质和基底膜的主要成分 IV 型胶原蛋白[2]。梁雨荣等[3]研究表明,其与各种肿瘤细胞转移浸润密切相关。本实验采用免疫组化方法对 CMM 组织中 Cath-D 及 MMP-9 进行检测,以探讨两者与 CMM 发生、发展和肿瘤浸润及淋巴结转移的关系。

[通信作者] 陈旻静,E-mail:chenmj67@yahoo.com.cn

1 资料与方法

1.1 标本来源

选取 2006-2011 年郑州大学第一附属医院病理科确诊为皮肤恶性黑色素瘤存档蜡块 44 例,其中男性 20 例,女性 24 例,年龄 30～80 岁,平均 54 岁。按有无淋巴结转移分为:淋巴结转移者 20 例,无淋巴结转移者 24 例;按浸润深度分为:Ⅰ级(表皮及附属器上皮)10 例,Ⅱ～Ⅲ(真皮乳头层)14 例,Ⅳ(真皮网状层)11 例,Ⅴ(皮下组织)9 例。交界痣 22 例。收集我院整形外科行全厚皮片移植的非癌患者手术时修剪所剩的正常皮肤 20 例作为正常对照。所有研究对象有完备的病史资料,且无其他皮肤病等合并疾病,术前未行任何治疗。

1.2 实验方法及试剂

蜡块 4 μm 连续切片,采用链菌素生物素-过氧化物酶法(S-P),实验步骤严格按照试剂盒说明书进行。鼠抗人 Cath-D 单克隆抗体(浓缩型)、兔抗人 MMP-9 多克隆抗体(浓缩型)、S-P 免疫组化试剂盒(通用型,工作液)均购自北京中杉生物制品有限责任公司。Cath-D、MMP-9 工作液浓度均为 1∶100,用 PBS 液代替一抗作阴性对照,用已知的阳性切片作阳性对照。

1.3 结果判定

1.3.1 判定依据 根据文献[4－5]的标准进行染色评分,每张切片在×400 倍光学显微镜下任选取 5～10 个视野,每个视野计数 100～200 个细胞。Cath-D 或 MMP-9 蛋白阳性细胞率的计算方法为阳性细胞数/观察细胞数×100%。

1.3.2 Cath-D 蛋白的阳性表达结果判定采用综合计分的方法

①染色强度:与背景颜色相对比,无色或为 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分;②染色范围:阳性细胞率<5% 为 0 分,阳性细胞率 5%～25% 为 1 分,阳性细胞率 26%～50% 为 2 分,阳性细胞率>50% 为 3 分。两项评分之和判断结果,≥2 分为阳性,<2 分为阴性。

1.3.3 MMP-9 蛋白的阳性表达结果也采用综合计分的方法

①染色强度:与背景颜色相对比,无着色 0 分,浅黄色为 1 分,棕黄色为 2 分,深棕黄色为 3 分;②染色范围:阳性细胞率<5% 为 0 分,阳性细胞率 5%～25% 为 1 分,阳性细胞率 26%～50% 为 2 分,阳性细胞率 51%～75% 为 3 分,阳性细胞率>75% 为 4 分。两项评分之和判断结果,≥3 分为阳性,<3 分为阴性。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件。各组标本中蛋白阳性表达率采用行×列表 χ^2 检验、χ^2 分割检验,皮肤恶性黑色素瘤中 Cath-D 和 MMP-9 的表达关系采用 Spearman 等级相关分析。

2 结果

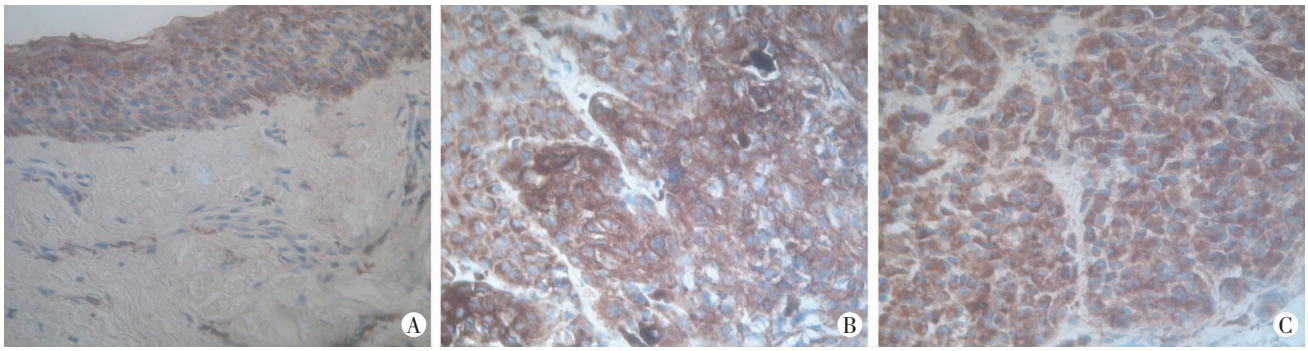
2.1 各组标本中 Cath-D 和 MMP-9 的表达

Cath-D 和 MMP-9 蛋白在各组中的阳性表达见表 1。Cath-D、MMP-9 均定位于细胞的细胞质,阳性细胞呈棕黄色颗粒状染色(图 1、2)。由表 1 可知 CMM 中 Cath-D 和 MMP-9 的阳性表达率高于交界痣和正常皮肤($P<0.05$)。

表 1 Cath-D 和 MMP-9 在各组标本中表达的阳性例数(%)

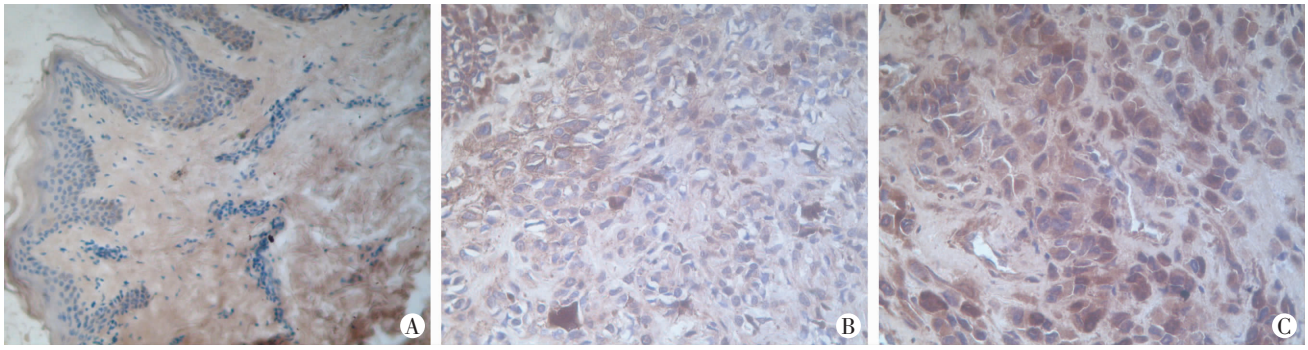
组织	n	Cath-D 蛋白(%)	MMP-9 蛋白(%)
正常皮肤组织	20	3(15.00)	6(30.00)
交界痣组织	22	10(45.45)	9(40.91)
CMM 组织	44	35(79.55)[a]	33(75.00)[a]

a: $P<0.05$,与交界痣组织及正常皮肤组织比较



A:正常皮肤组织;B:交界痣组织;C:皮肤恶性黑色素瘤组织

图 1 免疫组化染色观察各组 Cath-D 蛋白的表达 (S-P ×400)



A:正常皮肤组织;B:交界痣组织;C:皮肤恶性黑色素瘤组织

图 2 免疫组化染色观察各组 MMP-9 蛋白的表达 (S-P ×400)

表2 Cath-D和MMP-9在CMM中的表达与临床病理学特征的关系

病理学特征	n	Cath-D				MMP-9			
		阳性例数	阳性率(%)	χ^2值	P值	阳性例数	阳性率(%)	χ^2值	P值
浸润深度									
Ⅰ级	10	4	40.00	12.939	0.005	4	40	11.046	0.011
Ⅱ~Ⅲ级	14	12	85.71			11	78.57		
Ⅳ级	11	10	90.91			9	81.82		
Ⅴ级	9	9	100.00			9	100.00		
淋巴结转移									
有	20	20	100.00	9.429	0.002	19	95.00	7.822	0.006
无	24	15	62.5			14	58.33		

2.2 Cath-D和MMP-9在CMM中的表达与临床病理学特征的关系

Cath-D和MMP-9在CMM中的表达与临床病理学特征的关系见表2。在CMM中,Cath-D和MMP-9的阳性表达率随着肿瘤细胞浸润深度增加及淋巴结转移的产生明显增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.3 CMM中Cath-D和MMP-9表达的关系

CMM中Cath-D和MMP-9的表达呈正相关关系($r_s=0.488$, $P<0.05$)。

3 讨论

CMM的恶性程度较高,可较早发生血管淋巴管转移,这是导致患者死亡率高、预后差的主要原因,因此探讨CMM浸润转移过程中相关影响因素对于CMM的早期诊断治疗及预后意义重大。而其中肿瘤细胞细胞外基质成分及其基底膜的降解是肿瘤浸润转移的关键。

Cath-D是一种普遍存在于人体细胞中的溶酶体酶,主要分布在胞质或胞膜上,浓度较低,其功能主要是在溶酶体内酸性环境下分解蛋白质[6]。有研究显示Cath-D与肿瘤细胞的侵袭转移及肿瘤分化程度、转移和预后密切相关。其可以间接破坏基底膜,消化细胞外基质,从而使肿瘤细胞进入淋巴或血液循环,导致局部或全身转移[7]。本实验研究结果显示CMM组织中的Cath-D阳性表达率为79.55%,明显高于正常皮肤组织(15.00%)及交界痣(45.45%),且随着肿瘤细胞浸润深度的增加,Cath-D表达逐渐增高,淋巴结转移组阳性表达率(100%)高于无转移组(62.5%),提示Cath-D可能通过以下机制能促进细胞增殖和肿瘤浸润转移,Cath-D是一种蛋白水解酶,活化后可使基底膜、细胞外基质和结缔组织降解,形成局部溶解区,这也是肿瘤细胞发生转移的关键步骤[8]。Cath-D还可作为其他组织蛋白酶的生理性调节剂,激活组织蛋白酶B,继而依次激活尿激酶型纤溶酶原,使其转变为纤溶酶。组织蛋白酶B和纤溶酶均参与细胞外间质水解,从而促进肿瘤侵袭转移[9]。Rochefort等[10]认为Cath-D在导致癌浸润转移机制上起着一种关键的作用,这种作用的机制一方面是使癌细胞通过直接消化细胞外基质或间接破坏基底膜的作用,另一方面还可通过降低肿瘤抑制因子的活性,加快肿瘤细胞的生长而实现。也有研究者发现,Cath-D增加与肿瘤分化程度的降低、浸润深度的增加和转移的发生有关[11],与本研究结果一致。

MMPs是一组能够水解细胞外基质的蛋白裂解酶,包括基质中以及整合于质膜中的各种胶原酶和弹性蛋白酶等。MMP-9是其家族中的重要一员,又称Ⅳ型胶原酶或明胶酶B,可使肿瘤细胞浸润结缔组织基质,侵入小血管和淋巴管而发生转移,这种作用的机制主要是其通过水解细胞外基质及基底膜中的Ⅳ型、Ⅴ型胶原和凝胶、弹力蛋白成分,从而导致基底膜受到破坏而实现[12]。本实验结果显示:CMM组织中的MMP-9阳性表达率(75.00%)明显高于正常皮肤组织(30.00%)及交界痣(40.91%),随着肿瘤细胞浸润深度的增加,MMP-9表达逐渐增高,且淋巴结转移组阳性表达率(95.00%)高于无转移组(58.33%),提示MMP-9对CMM的发生、发展起重要作用,与CMM的转移关系密切。随着肿瘤细胞中MMP-9表达的增多,其降解破坏细胞外基质及基底膜的能力增加,最终癌细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润,并向其他部位转移。因此其可以作为恶性黑色素瘤浸润转移的重要分子标志。

有研究表明[13-15],Cath-D可促进基质中成纤维母细胞合成分泌MMP-9,主要是通过其前体形式即Pro Cath-D激活MAPK通路,进而影响API和ETS转录因子而实现的;Cath-D在体内可自体激活,且无内源性拮抗剂存在,所以可以打破体内其他内源性拮抗剂和蛋白水解酶类的平衡,通过激活uPA系统引发瀑布式的联级放大效应而激活MMP-9。本实验中相关性分析表明,Cath-D和MMP-9在CMM中的表达呈正相关,表明二者可能通过以上机制在促进肿瘤细胞增殖及浸润转移,新生血管形成等方面发挥了协同作用。

综上所述,本实验通过对Cath-D和MMP-9在CMM中异常表达的研究,表明CMM中Cath-D和MMP-9的大量表达及共同作用在促进CMM的发生、发展及浸润转移方面发挥了重要作用。联合检测两者

可能为CMM临床诊疗及预后评价提供新的理论依据和靶点。

参考文献：

[1] Baselga J. Why the epidermal growth factor receptor? The rationale for cancer therapy[J]. Oncologist, 2002, 7 Suppl 4: 2-8.
[2] 傅勇，胡华梅，谭益，等. 基质金属蛋白酶-9基因多态性与食管鳞状细胞癌易感性的关联研究[J]. 第三军医大学学报，2009，31(12)：1131-1134.
[3] 梁雨荣，赵涛，何尔斯泰，等. 基质金属蛋白酶MMP9和MMP2与胃癌转移的关系[J]. 中华普通外科杂志，2000，15(2)：119.
[4] 谢小卫，杜红文，孙兴旺，等. 乳腺癌组织中PCNA和Cath-D的表达及相关性研究[J]. 现代肿瘤医学，2010，18(5)：903-905.
[5] 李卫东，姚庆娟，刘刚，等. 结直肠癌VEGF和MMP-9基因的表达[J]. 中国肿瘤临床，2008，35(13)：756-760.
[6] 肖华亮，王东，李增鹏，等. 骨肉瘤组织蛋白酶D表达及其与预后的关系[J]. 第三军医大学学报，1999，21(2)：109-112.
[7] 何杨，彭玉珍，郭祖峰，等. KISS-1、Cath-D及VEGF在乳腺癌组织中的表达及相关性[J]. 皖南医学院学报，2009，28(6)：402-404.
[8] 乌拉木，余科达，沈镇宙，等. 组织蛋白酶D在乳腺导管内癌及伴早期浸润中的表达及其与复发转移的关系[J]. 中国癌症杂志，2010，20(4)：247-250.
[9] 吴忠新，谢慧君，蔡德巍，等. Cath-D、PCNA、nm23蛋白在宫颈鳞癌中的表达及临床意义[J]. 实用临床医药杂志，2009，13(6)：46-49.
[10] Rochefort H, Garcia M, Glondu M, *et al*. Cathepsin D in breast cancer: mechanisms and clinical applications, a 1999 overview[J]. Clin Chim Acta, 2000, 291(2): 157-170.
[11] Kantsaliev A L, Kozyreva E A, Kushlinskii N E, *et al*. Cathepsin D activity in gastric cancer[J]. Vopr Onkol, 1994, 40(1/3): 40-46.
[12] Li Y, Ma J, Guo Q, *et al*. Overexpression of MMP-2 and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma[J]. Dis Esophagus, 2009, 22(8): 664-667.
[13] 唐忠辉，蔡庆发，陈秀娇，等. MMP-9、Cath-D阳性与胃癌生物学行为相关性[J]. 中国癌症杂志，2004，14(2)：131-134.
[14] Papathoma A S, Petraki C, Grigorakis A, *et al*. Prognostic significance of matrix metalloproteinases 2 and 9 in bladder cancer[J]. Anticancer Res, 2000, 20(3B): 2009-2013.
[15] McKinnon T, Chakraborty C, Gleeson L M, *et al*. Stimulation of human extravillous trophoblast migration by IGF-II is mediated by IGF type 2 receptor involving inhibitory G protein(s) and phosphorylation of MAPK[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2001, 86(6): 3665-3674.

（**收稿**：2011-11-04；**修回**：2011-12-26）
（编辑　王小寒）

文章编号：1000-5404(2012)10-1005-01

经验交流

艾滋病眼部并发症5例误诊分析

杨　娟，韩晓丽，徐国兴，朱学军，胡建章　（350004 福州，福建医科大学附属第一医院眼科）

［**关键词**］ 艾滋病；并发症；误诊；眼
［**中图法分类号**］ R771.3　［**文献标志码**］ B

人类免疫缺陷病毒(human immunodeficiency virus，HIV)侵犯人体引起的获得性免疫缺陷综合征(acquired immunodeficiency syndrome，AIDS)是目前威胁人类健康的一种严重疾病。随着AIDS发病率逐年上升，这类病例离我们越来越近。笔者在临床工作中收集了5例以眼部症状首发，在多家医院眼科门诊误诊的AIDS眼部并发症病例，对其误诊原因进行分析。

1　资料与方法

1.1　一般资料

2004年6月至2011年9月在本院眼科中心就诊，以眼部损害为首发症状，最后经福州市疾病控制中心确认为AIDS患者5例9眼，其中男性3例，女性2例，年龄24～37岁，平均31.4岁。5例患者均有在国内多家大型医院眼科门诊诊治病史，2例诊断为“虹膜睫状体炎”，1例为“全葡萄膜炎”，1例为“视神经炎”，1例“视网膜中央静脉阻塞”，均予大剂量激素治疗，后病情迅速恶化，失明，4例患者双眼先后发病，就诊我院时均为病程进展期，因病情进展凶险收住院治疗，住院常规行HIV抗体检测，结果阳性，后经福州市疾病控制中心行Western-blot检测，确诊为AIDS。结合患者临床症状，体征，行眼底血管荧光造影(fundus fluorescein angiography，FFA)检查后3例最后诊断为“急性视网膜坏死综合征”，2例诊断为“巨细胞病毒性视网膜炎”。

1.2　临床特点

2例自诉有反复发热史、消瘦、疲乏无力等症状，余3例患者全身无异常症状。均以视物不清、眼前黑影为主诉就诊，随病情进展有3例患者出现眼红、眼痛等症状。体征：视力急剧下降，5例患者均在1个月内视力由正常降至无光感，后发病眼视力下降同样迅速。其中3例患者早期眼底后极部仅表现为色素紊乱，病情进展出现视网膜坏死病灶，后出现严重的眼前段炎症反应，表现为：角膜后沉积物、前房闪辉、虹膜局限性后粘连、梅花瞳甚至瞳孔膜闭、玻璃体混浊、眼底窥不清。另2例患者无眼前段体征，眼底病灶呈典型的“比萨饼样”病变：视网膜水肿出血、渗出、大面积棉绒斑、视网膜血管白鞘、结节状血管[1]。病变可累及视神经。眼底血管荧光造影检查：2例患者(后诊断为巨细胞病毒性视网膜炎)FFA检查表现为：造影早期病灶为低荧光或遮蔽荧光，随造影进程出现荧光渗漏，荧光增强，病灶周围可见毛细血管无灌注区，微血管瘤样点状强荧光，晚期低荧光区周围伴视网膜荧光着染。视网膜动静脉均有荧光着染，结节样病变，视乳头严重水肿者伴视网膜动静脉充盈延迟。OCT检查：视网膜神经上皮层与其下色素上皮层间浆液性脱离。

［**通信作者**］ 杨　娟，电话：13509329650，E-mail：yjys96028@sina.com

（下转1010页）