论著

文章编号:1000-5404(2013)13-1406-04

WAVE1、MMP-2及MMP-9在卵巢癌组织中的表达及意义

申丽媛,唐良萄,张 婧,周碎央 (400016 重庆,重庆医科大学附属第一医院妇产科)

[摘要] **目的** 探讨WASP家族富含脯氨酸同源蛋白1(WASP-family verprolin-homologous protein 1,WAVE1)及基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinases-2,MMP-2)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在卵巢癌的表达及临床意义。**方法** 采用免疫组化SABC三步法检测47例卵巢癌、30例卵巢良性肿瘤和21例正常卵巢组织中WAVE1、MMP-2、MMP-9的表达,并对卵巢癌组织WAVE1与MMP-2、MMP-9的表达进行相关性分析。**结果** ①WAVE1、MMP-2及MMP-9在卵巢癌中的表达均高于在正常卵巢组织及卵巢良性组织中的表达,差异有统计学意义($P<0.05$);Spearman相关分析显示,WAVE1和MMP-2、MMP-9两两表达成正相关($r=0.773$, $r=0.664$, $P<0.05$)。②WAVE1的表达与卵巢癌的临床分期、组织分化及Ca-125水平有关($P<0.05$),与年龄、肿瘤的直径无关($P>0.05$)。MMP-2、MMP-9表达与卵巢癌的临床分期有关($P<0.05$),与年龄、组织分化、Ca-125水平及肿瘤直径无关($P>0.05$)。**结论** WAVE1和MMP-2、MMP-9在卵巢癌中呈现高表达,早期联合筛查WAVE1和MMP-2、MMP-9指标对卵巢癌病情演变和预后评估有着重要的临床意义。

[关键词] 卵巢癌;WAVE1;基质金属蛋白酶-2;基质金属蛋白酶-9
[中图法分类号] R446.9; R730.23; R737.31 [文献标志码] A

Expression and significance of WAVE1, MMP-2 and MMP-9 in ovarian cancer

Shen Liyuan, Tang Liangdan, Zhang Jing, Zhou Suiyang (Department of Obstetrics and Gynecology, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China)

[**Abstract**] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of WASP-family verprolin-homologous protein 1 (WAVE1), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and -9 (MMP-9) in ovarian cancer. **Methods** The expression of WAVE1, MMP-2 and MMP-9 in 47 cases of ovarian cancer tissues, 30 cases of benign ovarian tumor tissues and 21 cases of normal ovarian tissues were detected by SABC immunohistochemical method. The correlation among WAVE1, MMP-2 and MMP-9 was analyzed. **Results** The positive expression rates of WAVE1, MMP-2 and MMP-9 in ovarian cancer tissues were significantly higher than those in benign ovarian tumor tissues and normal ovarian tissues ($P<0.05$). Spearman correlation analysis showed that positive correlation were found among WAVE1, MMP-2 and MMP-9 in ovarian cancer ($P<0.05$). The expression of WAVE1 was correlated with the clinical stage, histological differentiation and Ca-125 level ($P<0.05$) rather than the age and the size of tumor ($P>0.05$), while the expression of MMP-2 and MMP-9 was correlated with the clinical stage of ovarian cancer ($P<0.05$) rather than the age, histological differentiation, Ca-125 level and the size of tumor ($P>0.05$). **Conclusion** WAVE1, MMP-2 and MMP-9 are highly expressed in ovarian cancer tissues. Combined screening of WAVE1, MMP-2 and MMP-9 at early stage may have crucial clinical significance for evaluation of progress and prognosis of ovarian cancer.

[**Key words**] ovarian cancer; WASP-family verprolin-homologous protein 1; matrix metalloproteinase-2; matrix metalloproteinase-9

Supported by the National Natural Science Foundation of China (30772034), the Specialized Research Fund for Doctoral Program of Higher Education (200806310001); the Key Project of Chongqing Municipal Health Bureau (2009-1-59), the Key Project of First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University (YXJJ2009-05). Corresponding author: Tang Liangdan, E-mail: ldtang2002@yahoo.com.cn

卵巢癌(ovarian cancer,OC)是女性生殖系统最常见的恶性肿瘤之一,由于发病隐匿,早期无症状,70%~80%患者确诊时已到晚期(Ⅲ期或Ⅳ期),死亡率居妇科恶性肿瘤之首[1]。因此,人们一直致力于寻找对早期卵巢癌标志物及对其侵袭和转移有价值的预测指标。WAVE1(WASP-family verprolin-homologous protein 1,WAVE1)是一种新型的重要肌动蛋白调节蛋白,近年发现WAVE1广泛高表达于多种恶性肿瘤,且在肿瘤的侵袭和转移机制中发挥重要作用。基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases,MMPs)是人体内能

[基金项目] 国家自然科学基金(30772034);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(200806310001);重庆市卫生局重点项目(2009-1-59);重庆医科大学附属第一医院重点项目(YXJJ2009-05)
[通信作者] 唐良萄,E-mail:ldtang2002@yahoo.com.cn
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130308.1536.002.html(2013-03-08)

够降解基底膜和细胞外基质的主要成分，MMP-2、MMP-9同属明胶酶类，主要降解细胞外基质中Ⅳ型胶原，在肿瘤侵袭和转移中发挥重要的作用。前期研究中，课题组通过反向捕获抗体芯片技术筛查发现，WAVE1在卵巢癌中高表达[2]。为进一步探讨WAVE1在卵巢癌中的作用，本课题采用免疫组织化学SABC法检测WAVE1、MMP-2和MMP-9在不同卵巢组织中表达，从而探讨它们在卵巢癌发生、发展中的作用及其临床意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集重庆医科大学附属第一医院妇产科2010年2月至2011年10月住院患者手术切除后病理证实为卵巢癌47例，卵巢良性肿瘤30例，同时取同期因子宫肌瘤或早期宫颈癌患者手术时所切正常卵巢组织21例作为阴性对照。均为首发病例，术前未经放疗和化疗。所获标本均征得患者知情同意。按国际妇产科联盟FIGO 2002年临床分期标准：早期（Ⅰ/Ⅱ期）15例；晚期（Ⅲ/Ⅳ）32例；病理分级：G_1级10例，G_2级20例，G_3级17例。新鲜标本取得后一部分立即放入液氮中冻存，再转入-80 ℃冰箱保存，另一部分放入甲醛中固定待用。

1.2 方法

采用免疫组织化学染色SABC法。所有标本石蜡包埋固定后，4 μm厚连续切片制片，常规脱蜡、水化后，3% H_2O_2室温封闭，枸橼酸盐缓冲液微波修复抗原，滴加正常山羊血清封闭液后，分别滴加一抗：羊抗人WAVE1单克隆抗体（Santa Cruz biotechnology, Inc），1∶50稀释；兔抗人MMP-2多克隆抗体、兔抗人MMP-9多克隆抗体（均购自武汉三鹰生物技术有限公司）1∶50稀释，4 ℃过夜，选用PBS代替一抗作阴性对照。加生物素标记的二抗后，滴加试剂SABC，37 ℃孵育20 min，PBS冲洗3次（5 min/次），DAB显色，蒸馏水洗、苏木精复染、脱水、透明、封片、镜检。

1.3 判断标准

WAVE1蛋白主要表达在细胞膜和细胞质，MMP-2、MMP-9主要表达于细胞质。每张切片于显微镜下观察，随机选择5个具有代表性的高倍镜视野，每个视野计数100个细胞。根据阳性细胞染色强度及所占比例进行综合评分，其中染色强度：黄褐色3分，棕黄色2分，浅黄色1分，无染色0分；阳性细胞比例：无阳性细胞0分，1%～25%为1分，<25%～50%为2分，<50%～75%为3分，<75%～100%为4分。阳性细胞比例得分及染色强度得分相加：0～1分为阴性（-），2～3分为弱阳性（+），4～5分为阳性（++），6～7分为强阳性（+++）[3]。

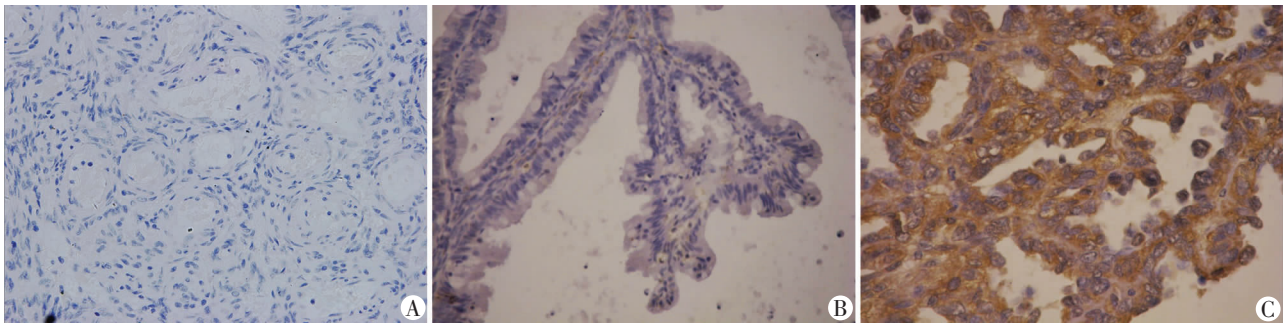
1.4 统计学分析

采用SPSS 17.0统计软件对数据进行统计分析，阳性率比较采用χ^2检验，采用双变量Pearson相关分析法分析WAVE1、MMP-2、MMP-9之间的相关性。

2 结果

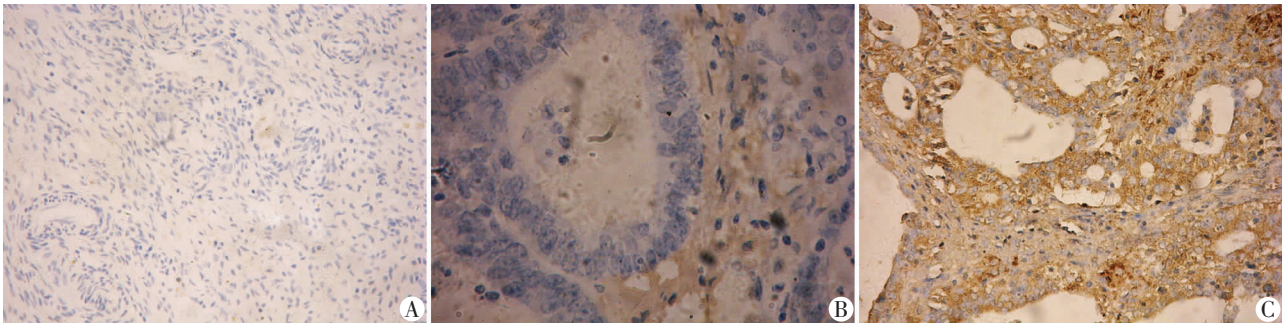
2.1 各组WAVE1、MMP-2、MMP-9表达

WAVE1主要表达在细胞膜和细胞质中，MMP-2和MMP-9主要在胞浆中表达，呈明显黄色或棕黄色颗粒（图1～3），WAVE1、MMP-2和MMP-9阳性表达率在卵巢癌组均高于在卵巢良性组及正常组表达，差异有统计学意义（$P<0.05$），卵巢良性组与正常组比较，差异无显著性（$P>0.05$）。见表1。



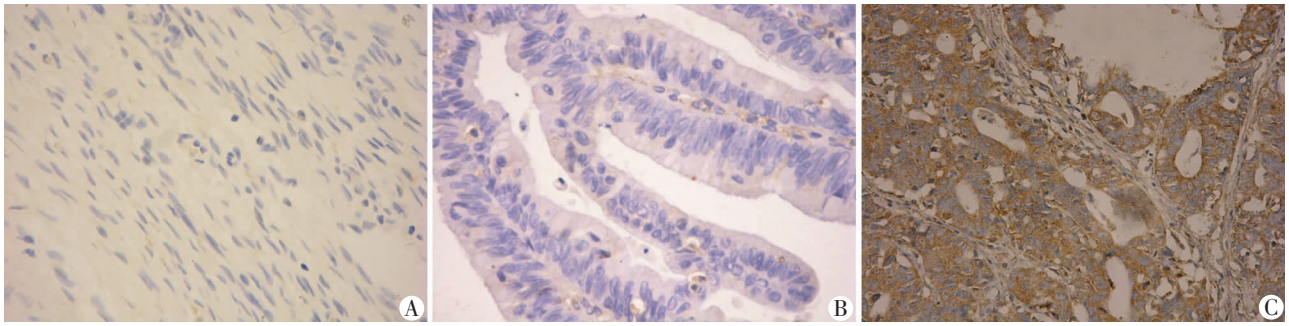
A：正常卵巢组织；B：良性肿瘤组织；C：卵巢癌组织

图1 免疫组织化学染色观察不同卵巢组织WAVE1的表达 （SABC ×200）



A：正常卵巢组织；B：良性肿瘤组织；C：卵巢癌组织

图2 免疫组织化学染色观察不同卵巢组织MMP-2的表达 （SABC ×200）



A:正常卵巢组织;B:良性肿瘤组织;C:卵巢癌组织

图3 免疫组织化学染色观察不同卵巢组织MMP-9的表达 (SABC ×200)

表1 WAVE1、MMP-2和MMP-9在不同卵巢组织中的表达

组织类型	n	WAVE1			MMP-2			MMP-9		
		−	+ ~ +++	阳性率(%)	−	+ ~ +++	阳性率(%)	−	+ ~ +++	阳性率(%)
卵巢癌组织	47	12	35	74.47[ab]	8	39	82.98[ab]	12	35	74.47[ab]
卵巢良性肿瘤组织	30	25	5	16.67	20	10	33.33	24	6	20.00
正常卵巢组织	21	20	1	4.76	18	3	14.29	20	1	4.76

a:$P<0.05$,与卵巢良性肿瘤比较;b:$P<0.05$,与正常卵巢组织比较

表2 不同卵巢组织WAVE1、MMP-2及MMP-9的表达与卵巢癌临床病理特征的关系

临床病理特征	n	WAVE1表达		P值	MMP-2表达		P值	MMP-9表达		P值
		−	+ ~ +++		−	+ ~ +++		−	+ ~ +++	
年龄(岁)				0.668			0.470			0.270
<50	21	6	15		5	16		7	14	
≥50	26	6	20		3	23		5	21	
分化程度				<0.001			0.449			0.439
1级	10	7	3		3	7		4	6	
2~3级	37	5	32		6	32		8	29	
病理类型				0.679			0.849			0.797
浆液性	22	5	17		3	19		6	16	
非浆液性	25	7	18		5	20		6	19	
临床分期				<0.001			0.014			<0.05
Ⅰ~Ⅱ期	15	8	7		6	9		8	7	
Ⅲ~Ⅳ期	32	4	28		2	30		5	27	
肿瘤直径(cm)				0.738			0.684			0.271
<10	12	4	8		3	9		5	7	
≥10	35	8	27		5	30		7	28	
Ca-125(U/mL)				<0.05			0.195			0.738
<35	12	7	5		4	8		4	8	
≥35	35	5	30		4	31		8	27	

2.2 WAVE1、MMP-2和MMP-9在卵巢癌组织的表达与临床病理特征的关系

从表2可以看出WAVE1的表达与患者的临床分期、组织分化程度及Ca-125值密切有关($P<0.05$),而与患者年龄、病理类型及肿瘤直径无关。即临床分期越晚、组织分化程度越低,Ca-125越高,WAVE1的阳性表达率越高。同时MMP-2、MMP-9的表达与患者临床分期有关($P<0.05$),而与年龄、病理类型、组织分化、Ca-125值及肿瘤直径无关($P>0.05$)。

2.3 WAVE1、MMP-2与MMP-9在卵巢癌中表达的相关性分析

Spearman等级相关性分析显示,卵巢癌中WAVE1与MMP-2、MMP-9之间表达均呈正相关(r值分别为0.773和0.664,$P<0.05$)。

3 讨论

卵巢癌已成为危害女性身体健康的主要杀手,其死亡率在妇科恶性肿瘤中位居首位,5年存活率仅为25%~30%。因此,寻求一种反映卵巢癌早期病变,疾病演变且灵敏性强的指标对延长患者的生命有着重要的临床意义。本实验通过检测WAVE1、MMP-2和MMP-9在卵巢癌组织中的表达以探讨它们是否可作

为卵巢癌的早期筛查、病情演变和预后评估指标。

侵袭和转移是恶性肿瘤患者治疗失败和致死的主要原因之一,它是一个多步骤、多阶段、多基因参与的复杂过程[4]。有报道称 WASP 家族中的 WAVE1 作为 Rac 的下游效应物,其在肿瘤细胞增殖、凋亡、侵袭和转移等生物学过程中扮演重要的角色。Fernando 等[5]通过敲除 WAVE1 基因,发现前列腺癌细胞的侵袭和转移能力显著减弱。Yang 等[6]发现 WAVE1 在白血病患者中高表达,并与患者不良预后密切相关,同时 Kang 等[7]发现其在白血病中是一个新型抗凋亡、耐药及热应激蛋白。由此可见,WAVE1 基因不仅参与肿瘤疾病的发生、发展,而且对肿瘤患者的预后判断也有着极其重要的价值。本研究免疫组化结果发现 WAVE1 在卵巢癌细胞的细胞膜、细胞质中呈现高表达,明显高于在卵巢正常组织及良性肿瘤的表达。结合临床病理参数分析,我们发现 WAVE1 在卵巢癌中表达与临床分期、组织分化程度及 Ca-125 表达水平呈正相关。由此说明,WAVE1 可作为卵巢癌疾病筛查的有效指标之一。

联合多个基因探讨肿瘤疾病形成的机制和寻求肿瘤筛查的有效指标是当前研究的焦点。本实验在 WAVE1 研究基础上继续探讨其与 MMPs 的关系,以揭示 WAVE1 和 MMP-2、MMP-9 在卵巢癌疾病中的作用和意义。MMP-2、MMP-9 是基质金属蛋白酶家族中的重要成员,它们主要通过降解各组织器官中基底膜的主要成分Ⅳ型胶原,促进肿瘤新生血管形成[8-9],参与肿瘤的侵袭和转移过程[10-13]。有报道,WAVE1 通过形成复杂的信号复合物激活 Arp2/3 引起肌动蛋白聚合、细胞骨架重排、板状伪足的形成及促使 MMP-2 等蛋白的释放[14-15]。Bjorklund 等[16]研究发现在小鼠胚胎成纤维细胞迁移中,WAVE1 缺乏将减少背部皱褶形成及随后基质金属蛋白酶(MMP)的分泌,主要是 MMP-2,导致细胞运动到细胞外基质的能力将减弱。本研究结果显示,MMP-2、MMP-9 在卵巢癌组中的阳性表达率明显高于卵巢良性组及正常组,且在晚期卵巢癌中的表达高于早期卵巢癌;其与患者年龄、组织分化程度、病理类型、Ca-125 值及肿瘤大小无关。WAVE1 联合 MMP-2、MMP-9 对卵巢癌进行分析,结果表明 WAVE1 和 MMP-2、MMP-9 表达呈正相关,由此推测两者有协同作用,WAVE1 可能通过上调 MMP-2、MMP-9 的表达,促使肿瘤细胞侵袭和转移,这与文献[17]报道一致。

综上所述,WAVE1 的表达上调可能通过刺激卵巢癌组织及周围间质组织分泌 MMP-2、MMP-9,从而在卵巢癌的发生、发展及侵袭转移过程中起着重要作用。通过早期筛查 WAVE1、MMP-2 及 MMP-9,对判断卵巢癌疾病的发展和判断预后有着非常重要的临床意义。而 WAVE1 和 MMPs 之间的具体作用机制及关系还需进一步研究,本课题组拟进一步在细胞及动物水平进行深入研究。

参考文献:

[1] Hall M, Rustin G. Recurrent ovarian cancer: when and how to treat [J]. Curr Oncol Rep, 2011, 13(6): 459-471.

[2] Tang L, Yang J, Ng S K, *et al*. Autoantibody profiling to identify biomarkers of key pathogenic pathways in mucinous ovarian cancer[J]. Eur J Cancer, 2010, 46(1): 170-179.

[3] 陈继红, 熊苗, 杨宾烈, 等. 诱骗受体3在子宫颈上皮内瘤变及子宫颈癌中的表达及临床意义[J]. 中华妇产科杂志, 2012, 47(2): 150-152.

[4] Hanahan D, Weinberg R A, *et al*. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[5] Fernando H S, Sanders A J, Kynaston H G, *et al*. WAVE1 is associated with invasiveness and growth of prostate cancer cells[J]. J Urol, 2008, 180(4): 1515-1521.

[6] Yang M H, Zhao M Y, Wang Z, *et al*. WAVE1 regulates P-glycoprotein expression *via* Ezrin in leukemia cells[J]. Leuk Lymphoma, 2011, 52(2): 298-309.

[7] Kang R, Tang D, Yu Y, *et al*. WAVE1 regulates Bcl-2 localization and phosphorylation in leukemia cells[J]. Leukemia, 2010, 24(1): 177-186.

[8] Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S, *et al*. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration[J]. Dev Cell, 2003, 5(4): 595-609.

[9] Lynch C C. Matrix metalloproteinases as master regulators of the vicious cycle of bone metastasis[J]. Bone, 2011, 48(1): 44-53.

[10] Roy R, Yang J, Moses M A. Matrix metalloproteinases as novel biomarkers and potential therapeutic targets in human cancer[J]. J Clin Oncol, 2009, 27 (31): 5287-5297.

[11] Rydlova M, Holubec L Jr, Ludvikova M Jr, *et al*. Biological activity and clinical implications of the matrix metalloproteinases[J]. Anticancer Res, 2008, 28(2B): 1389-1397.

[12] Tian M, Neil J R, Schiemann W P. Transforming growth factor-β and the hallmarks of cancer[J]. Cell Signal, 2011, 23(6): 951-962.

[13] Richardson B E, Beckett K, Nowak S J, *et al*. SCAR/WAVE and Arp2/3 are crucial for cytoskeletal remodeling at the site of myoblast fusion[J]. Development, 2007, 134(24): 4357-4367.

[14] Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2007, 8(1): 37-48.

[15] Gialeli C, Theocharis A D, Karamanos N K. Roles of matrix metalloproteinases in cancer progression and their pharmacological targeting [J]. FEBS J, 2011, 278 (1): 16-27.

[16] Bjorklund M, Koivunen E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1755(1): 37-69.

[17] 贺钰磊, 曹励之, 杨明华, 等. WAVE1 对 K562 细胞侵袭能力的影响及其机制研究[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(4): 237-241.

(**收稿**: 2012-11-06;**修回**: 2013-01-14)

(编辑 吴培红)