临床研究 文章编号:0253-3626(2010)12-1874-04

ILK 和 MMP9 在食管鳞癌组织中的表达及其意义

余俊隆,温剑虎

(重庆医科大学附属第一医院胸心外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨整合素连接激酶(Integrin-linked kinase,ILK)和基质金属蛋白酶(Matrix metallo proteinases,MMPs)在食管鳞癌组织中的表达及其与肿瘤组织分化程度原发肿瘤(Primans tumor,T)区域淋巴结(Regional lymph nodes,N)远处转移(Distant metastssis,M)分期;淋巴结转移及预后关系,分析两者是否存在相关性。方法:采用间接免疫荧光法检测 45 例食管鳞癌组织及 20 例食管正常黏膜组织中 ILK 和 MMP-9 表达情况,并结合临床和病理资料进行分析。结果:免疫荧光法结果显示:食管鳞癌组织中 ILK、MMP-9 阳性表达率分别为 68.89%(31/45),62.22%(28/45),正常食管黏膜组织中 ILK、MMP-9 阳性表达率 20%(4/20)和 30%(6/20)。随着肿瘤细胞病理分级,临床分期程度增高及淋巴转移,ILK、MMP-9 阳性表达率增高,各组间均有显著差异($P<0.05$),食管鳞癌组织与正常食管粘膜组织中 ILK、MMP-9 阳性表达比较均有显著差异($P<0.05$)。Kaplan-Meier 生存曲线法分析显示 ILK 高表达与 MMP-9 高表达患者生存时间明显低于 ILK 低表达与 MMP-9 低表达患者。结论:ILK、MMP-9 蛋白与食管鳞癌关系密切,ILK 和 MMP-9 在食管鳞癌组织中表达显著正相关($P<0.001$),表明 ILK 高表达或激活可能是 MMP-9 高表达或过表达原因之一。ILK 可作为判断食管鳞癌患者预后的主要参考指标,联合检测 ILK、MMP-9 表达有助于判断食管鳞癌患者的预后。

【关键词】食管癌;整合素连接激酶;明胶酶 B;免疫荧光化学

【中国图书分类法分类号】R735.1 【文献标识码】A 【收稿日期】2010-06-08

Expression of integrin-Linked kinase and Matrix metalloprotrinase-9 and their significance in esophageal sqamous carcinoma tissues

YU Jun-long, et al

(*Department of Cardiothoracic Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of ILK and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma and its relationship with tumor differentiation, TNM staging, lymph node metastasis and prognosis, and to understand whether there is correlation between ILK and MMP-9. *Methods*: The indirect immunofluorescence detection of ILK and MMP-9 expression in 45 cases of esophageal squamous cell carcinoma and 20 cases of normal esophageal mucosa were analyzed with clinical and pathological data. *Results*: The immunofluorescence results showed that the expression rates of ILK and MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma were 68.89% (31/45) and 62.22% (28/45). The positive rates of ILK and MMP-9 in normal esophageal mucosa were 20% (4/20) and 30% (6/20). As the tumor cell grade, clinical stage and lymph node metastasis increased the level of ILK and, MMP-9 expression rate increased, with significant difference among all groups ($P<0.05$). The positive expression of ILK, MMP-9 in esophageal squamous cell carcinoma and normal esophageal mucosa were significantly different ($P<0.05$). Kaplan-Meier analysis showed the survival time for patient with high expression of ILK and MMP-9 was significantly lower than that for patients with low expression of ILK and MMP-9. *Conclusion*: ILK, MMP-9 protein are closely related to esophageal squamous cell carcinoma, ILK expression or activation may be the reason for the high expression or over-expression of MMP-9. ILK could be used as an independent prognosis reference for esophageal squamous cell carcinoma, The joint detection of ILK and MMP-9 expression can help determine the prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinoma.

【Key words】Esophageal neoplasms; Integrin-Linked kinase; Gelatinase B; Immunofluorescence

肿瘤分子生物学研究表明:肿瘤的发生与细胞增殖和分化失常关系密切,而肿瘤的浸润和转移是其主要生物学特征,影响其治疗效果和预后。研究表明,整合素连接激酶(Integrin-linked kinase,ILK)是一种新近发现的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,它能通过作用于下游蛋白参与肿瘤细胞粘连、移动、酶降解和血管生成等多种肿瘤生物学行为,促进肿瘤的侵袭和转移[1]。基质金属蛋白酶(Matrix metallo proteinases,MMPs)

作者介绍:余俊隆(1985-),男,硕士,

研究方向:胸部肿瘤外科治疗。

通讯作者:温剑虎,男,教授,E-mail:tigerool@163.com。

家族成员中的 MMP-9 在癌细胞介导的细胞外基质降解中起着关键作用，破坏基底膜促进癌细胞的浸润和转移[2]。ILK 和 MMP-9 的表达异常与人类恶性肿瘤侵润和转移关系密切[3]。另外 ILK 刺激 MMP-9 的表达，参与肿瘤细胞迁徙和侵袭[4]。我们采用免疫荧光间接法对食管鳞癌组织中 ILK、MMP-9 的表达进行检测，以探讨其阳性表达与食管鳞癌组织分化程度、TNM 分期、淋巴结转移及预后的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

45 例食管鳞癌组织均为重庆医科大学附一院胸外科 2006 年 1 月 ~2007 年 1 月手术切除存档蜡块，经我院病理科确诊病理类型均为食管鳞癌，20 例正常食管黏膜组织均为我院胸外科同时期手术切除食管切缘存档蜡块，经我院病理科确诊未见侵袭。

1.2 临床资料及病理分级

45 例食管鳞癌按国际抗癌联盟（UICC）2009 年修订 TNM 分期标准分期，Ⅰ~Ⅱ期 18 例，Ⅲ~Ⅳ期 27 例。高分化鳞癌 5 例，中分化鳞癌 19 例，低分化鳞癌 21 例，淋巴结转移 32 例，无淋巴结转移 13 例。男性 26 例，女性 19 例，平均年龄 58 岁，所有患者术前未接受放化疗。有预后随访资料者 30 例，随访时间 1~30 个月，平均 19 个月，其中淋巴结转移者 17例，平均生存 12 个月，无淋巴结转移 13 例，平均生存 27.12 个月。

1.3 实验方法

间接免疫荧光法 45 例食管鳞癌及正常食管组织石蜡切片均行脱蜡，抗原修复（抗原修复液为 pH6.0 枸橼酸缓冲液）处理，再经 ILK 单抗（实验浓度：1:150，Santa Cruz 公司产品）和 MMP-9 单抗（实验浓度：1:150，Santa Cruz 公司产品）免疫组织化学染色，再行自带荧光二抗（实验浓度 1:100，北京中杉公司产品，自带荧光物为异硫氰酸荧光素或四乙基罗丹明）免疫荧光染色。染色方法按试剂盒说明书进行。以 PBS 液代替一抗及标记荧光二抗做自发荧光对照实验，以 PBS 代替一抗做荧光抗体对照实验，以标记荧光二抗与未标记荧光二抗混合液（未标记抗体多于标记抗体）代替标记荧光二抗做抑制实验。

1.4 结果判定

自发荧光对照，荧光抗体对照和抑制实验均为阴性，待测标本呈强荧光，即待测标本荧光是特异性荧光。荧光显微镜下观察标本特异性荧光强度：(-)无荧光；(±)极弱的可疑荧光；(+)荧光较弱，但清晰可见；(++)荧光明亮；(+++~++++)荧光闪亮。待测标本特异性荧光染色强度达“++”以上，而各种对照显示为“±”或“-”即判定为阳性。

1.5 统计学方法

数据采用 SPSS17.0 软件包进行 χ^2 检验分析，$P<0.05$ 有统计学意义，并计算列联系数，生存过程统计描述用 Kaplan-Meier 生存曲线法，并进行 Log-rank 检验。

2 结 果

2.1 ILK 在食管鳞癌组织中表达情况

45 例食管鳞癌组织中 ILK 阳性表达率为 68.89%（31/45）。ILK 免疫荧光染色定位于细胞质，表现为不同程度橘红色，基本不表达在细胞膜上，20 例正常食管粘膜组织 ILK 阳性表达率 20%（4/20），两者比较有统计学意义（χ^2=13.316，P<0.001）。在高中分化和低分化鳞癌阳性表达率分别 54.17%（13/24）和 85.17%（18/21）两者比较有统计学意义（χ^2=5.201，P=0.023）。Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期患者阳性表达率分别为 38.89%（7/18）和 88.89%（24/27）。两者比较差异显著（χ^2=12.598，P<0.001）；淋巴结转移组阳性表达率 81.25%（26/32）与无淋巴结转移组阳性表达率 38.46%（5/13）比较两者差异明显（χ^2=7.897，P=0.005）有统计学意义（表 1、图 1）。

2.2 MMP-9 在食管鳞癌组织中表达表达情况

45 例食管鳞癌组织中 MMP-9 阳性表达率为 62.22%（28/45）。MMP-9 免疫荧光染色定位于癌巢内癌细胞的胞质，也表达与癌巢周边的基质，血管内皮细胞及癌周侵润的单核细胞（主要为巨噬细胞），表现为不同程度蓝绿色荧光，20 例正常食管黏膜组织 MMP-9 阳性表达率 30.00%（6/20），两者

表 1 食管鳞癌 ILK 与 MMP-9 表达与其临床病理特征的关系

临床病理学特征	n	MMP-9 阳性			ILK 阳性		
		n(%)	χ^2 值	P 值	n(%)	χ^2 值	P 值
正常食管黏膜组织	20	6(30%)	5.763	0.016	4(20%)	13.316	<0.001
食管鳞癌组织	45	28(62.22%)			31(68.89%)		
分化程度							
高中分化	24	1(45.84%)	5.877	0.001 5	13(54.17%)	5.201	0.023
低分化	21	17 (80.95%)			18(85.71%)		
TNM 分期							
Ⅰ~Ⅱ期	18	8 (44.44%)	4.034	0.045	7(38.89%)	12.598	<0.001
Ⅲ~Ⅳ期	27	20(74.07%)			24(88.89%)		
淋巴结转移							
有	32	24(75%)	7.694	0.006	26(81.25%)	7.897	0.005
无	13	4(30.8%)			5(38.46%)		

比较有统计学意义（χ^2=5.763，P=0.001 6）。在高中分化和低分化鳞癌阳性表达率分别 45.84%（11/24）和 80.95%（17/21）两者比较有统计学意义（χ^2=5.877，P=0.015）。Ⅰ~Ⅱ期和Ⅲ~Ⅳ期患者阳性表达率分别为 44.44%（8/18）和 74.07%（20/27）。两者比较差异显著（χ^2=4.034，P=0.045）；淋巴结转移组阳性表达率 75.00%（24/32）与无淋巴结转移组阳性表达率30.77%（4/13）比较两者差异明显（χ^2=7.694，P=0.006）有统计学意义（表 1，图 2）。

2.3　ILK 与 MMP-9 共同在食管鳞癌组织中表达情况

ILK 与 MMP-9 共同表达 24 例食管鳞癌组织中，7 例仅表达 ILK，4 例仅表达 MMP-9，10 例癌组织中均未见两者表达。



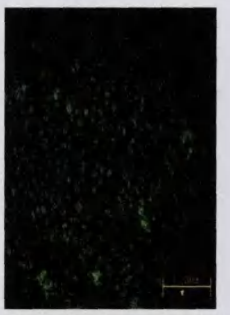
ILK 在低分化 ECA 中强阳性表达，ILK 蛋白免疫反应阳性细胞呈橘红色荧光（RB200 标记二抗）阳性细胞位于细胞质

图 1　食管鳞癌组织 ILK 的表达（免疫荧光染色 × 400）

ILK 与 MMP-9 的表达呈正相关（列联系数 C=0.452，P=0.001 7）。

2.4　ILK 与 MMP-9 的表达与食管鳞癌患者预后的关系

Kaplan-Meier 生存曲线分析显示，ILK 阳性表达与生存率呈负相关，ILK 阳性表达组的生存时间明显低于阴性表达组，Log-rank 检验两组生存曲线差异显著（t=4.349，P=0.037）。MMP-9 阳性表达与生存率呈负相关，MMP-9 阳性表达组生存时间明显低于阴性表达组，Log-rank 检验两组生存曲线差异显著（t=9.628，P=0.002）。经 Log-rank 检验两组差异比较亦有统计学意义（t=5.765，P=0.036 7），同样表明 ILK 与 MMP-9 表达与患者预后关系密切（图 3）。



MMP-9 在低分化 ECA 中强阳性表达，MMP-9 蛋白免疫反应阳性细胞呈蓝绿色荧光（FITC 标记二抗）阳性细胞位于癌巢内癌细胞的胞质，也表达与癌巢周边的基质，血管内皮细胞及癌周浸润的单核细胞（主要为巨噬细胞）

图 2　食管鳞癌组织 MMP-9 的表达（免疫荧光染色 × 400）

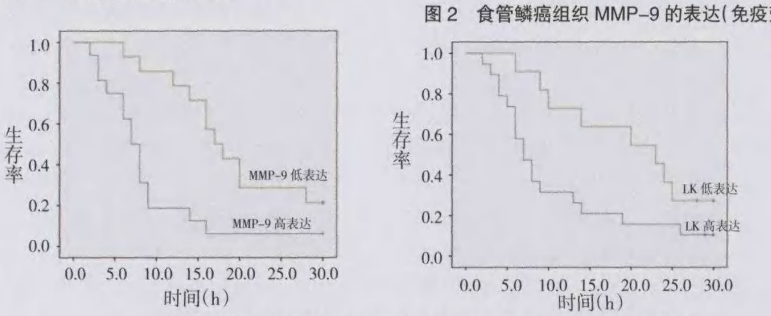


图 3　食管鳞癌 ILK 与 MMP-9 表达的 Kaplan-Meier 生存曲线

3　讨　论

ILK 是一个包含有 Ser/Thr 的蛋白激酶，能与整合素 β1 胞浆域结合分布于胞质内近胞膜处[5]，本实验中免疫荧光结果发现 ILK 表达于近胞膜处胞质内印证这点。ILK 作为整合素与生长因子受体信号传导途径中重要效应物之一[6]，通过介导细胞与 ECM 的信号传导，调控生长因子整合蛋白介导的信号传导及 WNT 等[7]多条信号传导途径，调节细胞粘连，生存，移动，运动，分化，凋亡及侵袭[8]。其相关蛋白 GSK3、PKB 等是细胞周期循环和细胞程序死亡的重要调节蛋白，同时研究表明[9]，抑制 ILK 的表达能抑制蛋白激酶 B（PKB/AKT）的活性，诱导细胞周期停滞及细胞凋亡，从而抑制肿瘤细胞的生长，因此 ILK 与肿瘤的形成有密切关系。目前研究证实 ILK 在前列腺癌[10]、乳腺癌[11]、胃癌[12]、卵巢癌[13]、非小细胞肺癌[14]等多种恶性肿瘤中具备癌基因的性质。免疫荧光结果显示：ILK 在 45 例食管鳞癌组织中阳性表达率 68.89%，其表达水平与正常食管粘膜相比有显著增高，这与 Graff 等在前列腺癌[10]，Ahmed 等在卵巢癌[13]，石蕊等在非小细胞肺癌[14]中的研究结果相符。ILK 在 45 例食管鳞癌组织中表达率在Ⅲ~Ⅳ期（88.89%）与Ⅰ~Ⅱ期（38.89%）相比显著升高；低分化组（85.71%）与高分化组（54.17%）相比显著升高。证实 ILK 表达水平与 TNM 分期正相关，随食管鳞癌分化程度降低而升高，而这与 ILK 在非小细胞肺癌[14]、乳腺癌[11]中的研究结果一致。这些证明 ILK 的高表达可能激活食管鳞癌组织中某些肿瘤相关因子和相关信号通路，从而参与食管鳞癌的形成发生。同时证明 ILK 高表达者食管鳞癌细胞的浸润性和转移性都增高。本研究还证实 ILK 与淋巴结转移呈正相关与 Ito 在胃癌[12]中研究结果一致，但由于淋巴结转移涉及太多因素，就目前研究分析 ILK 可能是诸多因素中上游位点。

MMPS 是一类与肿瘤浸润和转移有着密切关系的金属基质蛋白酶，在肿瘤降解细胞外基质，破坏基底膜，向外侵袭起着重要作用。MMP-9 是基质金属蛋白酶家族成员中的一

种，能有效降解细胞基底膜中主要成分Ⅳ型胶原，致使癌细胞向其他细胞浸润转移[15]。MMP-9 的表达异常与肿瘤侵袭与转移密切相关[16]。Ohashi 等[17]对 148 例食管鳞癌的研究发现，恶性程度高，淋巴结转移阳性 MMP-9 表达阳性率高，5 年生存率低。本实验免疫荧光结果显示：MMP-9 在 45 例食管鳞癌组织中阳性表达率 62.22%，MMP-9 在 20 例正常食管黏膜阳性表达率 30%两者比较差异显著有统计学意义。MMP-9 在 45 例食管鳞癌组织中表达率在Ⅲ~Ⅳ期(74.07%)与Ⅰ~Ⅱ期(44.44%)相比显著升高；低分化组(80.95%)与高分化组(45.84%)相比显著升高。证实 MMP-9 表达水平与 TNM 分期正相关，随食管鳞癌分化程度降低而升高，淋巴转移组(75%)显著高于无淋巴结转组(30.77%)。与 Ohashi 等在食管鳞癌的研究结果一致，证实 MMP-9 过表达者食管鳞癌细胞的侵袭性和转移性都增高。

目前国外有研究证实，ILK 可以使 MMP-9 表达上调[18]，参与生长因子信号通路[19]，从而使得细胞外基质降解，肿瘤血管生成增强并使细胞运动能力的活跃等不同方面促进淋巴结转移，由此推断阻断 ILK 可以很大程度上阻滞其下游引起肿瘤发生发展的途径，故而 ILK 有望成为临床工作中一有效的治疗靶点。本研究通过对随访资料采用 Kaplan-Meier 生存曲线分析显示，ILK 阳性表达与生存率呈负相关，ILK 阳性表达组的生存时间明显低于阴性表达组，Log-rank 检验两组生存曲线差异显著(t=4.349，P=0.037)。MMP-9 阳性表达与生存率呈负相关，MMP-9 阳性表达组生存时间明显低于阴性表达组，Log-rank 检验两组生存曲线差异显著(t=9.628，P=0.002)。经 Log-rank 检验两组差异比较亦有统计学意义(t=5.765，P=0.036 7)，表明 ILK 与 MMP-9 表达与患者预后关系密切，高表达 ILK 与 MMP-9 的食管鳞癌患者生存率低，且 ILK 与 MMP-9 表达呈正相关，表明两者间存在协调关系。目前研究认为 ILK 可影响 MMP-9 等肿瘤转移相关因素。从而影响淋巴结转移，由此可以得出结论：ILK 可以作为判断食管鳞癌患者预后重要因素，联合检测 ILK 和 MMP-9 有利于较好判断食管鳞癌患者预后，并预示通过阻断 ILK 活性，抑制 MMP-9 过表达，抑制细胞外基质降解、肿瘤血管生成等，从而达到控制治疗肿瘤目的。

参 考 文 献

[1] Marotta A, Parhar K, Owen D, et al. Characterisation of inten linked kinase signalling in sporadic human colon cancer[J]. Br JCancer, 2003, 88(11): 1755-1762.

[2] Zeng Zs, Guillem. Distinct pattern of matrix metalloproteinase 9 and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 mRNA expression in human colorectal cancer nnd liver metastases[J]. Br JCancer, 1995, 72(8): 575-579.

[3] 房 晓，张道荣. 整合素连接激酶和基质金属蛋白酶 MMP9 在非小细胞肺癌表达研究[J]. 中国组织学与细胞学杂志，2005，14(5)：151-154.

[4] 张占荣，杨国栋. 整合素连接激酶在肿瘤发生及进展中的作用[J]. 临床肿瘤学杂志，2006，11(11)：873-875.

[5] Hannigan G E, Leung-Hagesteijn C, Fitz-Gibbon L, et al. Regulation of cell adhesion and anchorage-dependent growth by a new beta 1-integrin-linked protein kinase[J]. Nature, 1996, 379(6560): 91-96.

[6] Reynolds A R, Reynlds L E, Nagel J E, et al. Elevated F1K1(vas-cular endothelial growth factor receptor2)signaling mediates enhanced angiogenesis in beta3-integin-deficient mice[J]. Cancer Res, 2004, 64(23): 8643-8650.

[7] Tan C, Costello P, Sanghera J, et al. Inhibition of integrin linkedkinase(ILK) suppresses beta-catenin-Lef/Tcf-dependent transcription and expression of the E-cadherin repressor, snail, in APC human colon carcinoma cells[J]. Oncogene, 2001, 20(1): 133-140.

[8] Ito R, Oue N, Zhu X, et al. Expression of integrin -linked kinase is closely correlated with invasion and metastasis of gastric carcinoma[J]. Virchows Arch, 2003, 442(2): 118-123.

[9] Persad S, Attwell S, Gray V, et al. Inhibition of inte grin-linked kinase (ILK)suppresses activation of protein kinase B/Akt and induces cell cycle arrest and apoptosis of PTEN-mutant prostate cancer cells[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, 97(7): 3207-3213.

[10] Graff J R, Deddens J A, Konicek B W, et al. Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(7): 1987-1991.

[11] Somasiri A, Howarth A, Goswami D, et al. Overexpression of the integrin-linked kinase mesenchymally transforms mammary epithelial cells [J]. Cell Sci, 2001, 114(Pt 6): 1125-1136.

[12] Ito R, Oue N, Zhu X, et al. Expression of integrin-linked kinase is closely correlated with invasion and metastasis of gastric carcinoma[J]. Virchows Arch, 2003, 442: 118-123.

[13] Ahmed N, Riley C, Olira K, et al. Integrin-linked kinase expression increases with ovarian tumour grade and is sustained by peritoneal tumour fluid[J]. Pathol, 2003, 201(2): 229- 237.

[14] 石 蕊，张道荣. 整合素连接激酶和基质金属蛋白酶 MMP9 在非小细胞肺癌表达研究[J]. 中国组织学与细胞学杂志，2005，14(5)：151-154.

[15] 高思海，赵全平. MMP-9 和 TIMP-1 在食管鳞癌中的表达及其淋巴结转移的关系[J]. 中国医师杂志，2005，7(8)：1016-1018.

[16] Lu X Q, Levy M, Weinstein I B, et al. Immunological quantitation of levels of tissue in hibitor of metalloproteinase-1 in human colon caner[J]. cancerRes, 1991, 5(23): 6231-6238.

[17] Ohashik, Nemotot, Nakamurak, et al. Increased expression of marix metalloproteinase 7 and 9 and membrane type 1-matrix metalloproteinase in esophageal squamous cell carcinomas[J]. Cancer, 2000, 88(10): 2201-2209.

[18] Wu C, Keightley S Y, Leung Hagesteijn C, et al. Integrin-linked protein kinase regulates fibronectin matrix assem bly, E-cadherin expression, and tumorigenicity[J]. J Biol Chem, 1998, 273(1): 528-536.

[19] Troussard A A, Costello P. Yoganathan T N, et al. The integrin linked kinase (ILK) induces an invasive phenotype via AP-1 transcription factor-dependent upregulation of matrix metalloproteinase 9(MMP-9)[J]. Oncogene, 2000, 19(48): 5444-5452.

(责任编辑：关蕴良)