基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0177-04

# Maspin 和 mmp-2 在非小细胞肺癌中的表达及其临床意义

卢 军[1],汪毓君[2],王家顺[3]

(1. 湖北省宜昌市第二人民医院胸外科,宜昌 443000;2. 武汉市二医院胸外科,武汉 430022;3. 华中科技大学同济医学院附属协和医院胸外科,武汉 430022)

【摘 要】目的:研究肿瘤抑制基因蛋白 maspin(Mammary-serpin)和基质金属蛋白酶 -2(Matrix metalloproteinase-2,mmp-2)在非小细胞肺癌(Non-small cell lung cancer, NSCLC)中的表达,探讨 maspin 和 mmp-2 的相关性及其与临床病理特征的关系。方法:选择手术切除的 65 例 NSCLC 患者的标本,肺部良性病变组织及正常肺组织标本各 8 例,采用免疫组化 SP 法检测 NSCLC 组织、肺部良性病变及正常肺组织中 maspin 和 mmp-2 的表达情况。结果:maspin 蛋白在正常肺组织和肺部良性病变组织中高表达,阳性率分别为 100%(8/8)和 87.5%(7/8),在 NSCLC 中其阳性率显著降低,为 15.4%(10/65)。mmp-2 在正常肺组织和肺部良性病变组织中不表达或低表达,阳性率分别为 12.5%(1/8)和 37.5%(3/8),而其在 NSCLC 中则显著高表达,阳性率为 73.3%。maspin 蛋白在 NSCLC 的表达与淋巴结转移相关,mmp-2 在 NSCLC 的表达与淋巴结转移和 TNM 分期相关,两者与性别、年龄、肿瘤大小、组织学类型和组织分化程度不相关。结论:maspin 蛋白在 NSCLC 中表达下调,mmp-2 在 NSCLC 中过度表达,并且 maspin 蛋白与 mmp-2 的表达成负相关($r_s$=-0.54,$P$=0.018)。它们在肺癌浸润转移中起重要作用,可作为反映肺癌病理生物学行为的有效指标。

【关键词】非小细胞肺癌;免疫组织化学;maspin ;基质金属蛋白酶 -2

【中国图书分类法分类号】R73-37 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-26

# Expressions of maspin and mmp-2 in non-small cell lung cancer and their clinical significance

*LU Jun, et al*

(*Department of Thoracic Surgery, the Second Hospital, Yichang Province*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expressions of maspin and the matrix metalloproteinase-2 and correlation between maspin and mmp-2 protein in NSCLC and their clinical significance. *Methods*: Immunohistochemical SP method was used to detect the expressions of maspin and mmp-2 in 65 NSCLC tssues, 8 tissues of benign disease of lung, and 8 normal lung tissues. *Results*: Maspin protein in normal lung tissues and benign lesions in the lungs were of high expression: the positive rates were 100% (8/8) and 87.5% (7/8) respectively. The positive rate of NSCLC showed a significant reduction which was 15.4% (10/65). mmp-2 in normal lung tissues and benign lesions of the lungs did not express or showed low-expression: the positive rates were 12.5% (1/8) and 37.5% (3/8) respectively, and its expression in NSCLC was significantly higher , which is 73.3%. Maspin protein expression in NSCLC had a correlation with lymph node metastasis, and mmp-2 expression in NSCLC had a correlation with lymph node metastasis and TNM staging. Both maspin protein and mmp-2 did not show correlation between the two genders, age, tumor size, or histological type. *Conclusion*: The expression of maspin protein in NSCLC is down-regulated and mmp-2 shows an over-expression in NSCLC. The expression of Maspin protein and mmp-2 has a negative correlation ($r_s$=-0.54, $P$=0.018). They play an important role in invasion and metastasis in lung cancer. They can be an effective indicator of biological behavior which can reflect lung cancer pathology.

【Key words】NSCLC; immunohistochemical; maspin; mmp-2

肺癌的死亡率在世界上居恶性肿瘤死亡率的第一位。侵袭和转移是导致肺癌患者死亡的主要原因。Maspin 基因是一新的抑癌基因,具有抑制肿瘤的生长、增加细胞的粘附、降低细胞的运动和侵袭并可抑制肿瘤血管的生成等功能。mmp-2 参与细胞外基质和基底膜的主要成分Ⅳ型胶原的降解,是肿瘤侵袭转移的标志物之一[1]。maspin 蛋白和 mmp-2 在肿瘤的恶性演进、侵袭转移及预后中均起着重要作用。目前,同时观

作者介绍:卢 军(1972-),硕士,副主任医师,研究方向:肺癌的早期发现。

通信作者:王家顺,男,教授,Email:yasewang999@sina.com。

察肺癌组织中的 maspin 蛋白和 mmp-2 的表达在国内外鲜有报道。本研究采用免疫组化 SP 法对人类肺癌中 maspin 和 mmp-2 进行检测，并结合临床及病理资料探讨两者在肺癌发生、发展上的作用及相互关系，为肺癌发生、发展的预测及预后判断提供有价值的资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究对象

65 例 NSCLC 患者的肺癌组织，其中男性 40 例，女性 25 例，年龄范围 38～76 岁，平均 51 岁；腺癌（含肺泡细胞癌、大细胞肺癌各 1 例）32 例，鳞癌 33 例；低分化、未分化 20 例，中分化 35 例，高分化 10 例；Ⅰ期（Ⅰa+Ⅰb）19 例，Ⅱ期（Ⅱa+Ⅱb）32 例，Ⅲ期（Ⅲa+Ⅲb）14 例；有淋巴结转移 42 例，未见淋巴结转移 23 例；术前均未接受放化疗。8 例肺部良性病变肺组织，其中炎性假瘤 5 例，结核瘤 2 例，错构瘤 1 例。8 例正常肺组织。以上组织均取自宜昌市第二人民医院胸外科 2008 年 9 月至 2009 年 12 月手术标本，所有病例均经手术后病理学确诊。

### 1.2 主要实验仪器与试剂

鼠抗人 maspin 单克隆隆抗体（购于英国 Novocastra 公司），免疫组织化学染色 SP 试剂盒和即用型 DAB 试剂盒（购于福州迈新技术开发有限公司），即用型鼠抗人 mmp-2 单克隆抗体（购于武汉博士德生物技术有限公司），Olympus 光学显微镜（日本）。

### 1.3 实验方法和步骤

所有组织标本离体后用 10% 中性福尔马林液固定，常规石蜡包埋，4 μm 厚连续切片，60℃烤箱烤片 30 min。免疫组化染色 SP 法，按操作说明进行，染色后中性树胶封片固定，显微镜观察。

### 1.4 实验对照

已知 maspin 蛋白阳性染色的乳腺癌石蜡切片为阳性对照，mmp-2 蛋白阳性染色的胃癌石蜡切片为阳性对照，以 PBS 代替一抗为阴性对照。

### 1.5 结果判断

maspin：染色结果以染色强度结合阳性细胞数百分比综合计分作定性分析。组织切片中胞质染为淡黄色至棕褐色者为阳性细胞标志。染色强度以多数细胞呈现的染色特性（染色深浅需与背景着色相对比）计分：0 分为无色，1 分为淡黄色，2 分为棕黄色，3 分为棕褐色。阳性细胞百分比即某类细胞 5 个视野（每 400 × 高倍视野计数 100 个此类细胞）的阳性细胞平均数：0 分为阴性，1 分为阳性细胞≤10%，2 分为 11%～50%，3 分为 51%～75%，4 分为 >75%。染色强度与阳性细胞百分比的乘积 0～2 分为阴性，记作“-”；3～12 分为阳性，记作“+”。

mmp-2：镜下肿瘤细胞浆中出现棕黄色颗粒为阳性细胞，染色细胞数 >25% 定为阳性，≤25% 为表达阴性。

### 1.6 统计学处理

所有数据用 SPSS13.0 统计软件包在计算机上进行处理分析。统计方法有 $\chi^2$ 检验、Spearman 等级相关分析。$P<0.05$ 判断为差异有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 maspin 和 mmp-2 在正常肺组织、肺部良性病变和 NSCLC 中的表达特点（见表 1）

Maspin 蛋白在正常肺组织和肺部良性病变中主要表达于细胞胞浆内，细胞核内与细胞膜上有少许表达，阳性表达率高，分别为 100%（8/8）和 87.5%（7/8），在非小细胞肺癌细胞中 maspin 主要表达于细胞核内，并且其阳性率显著降低，为 15.4%（10/65）；肺癌组织中 mmp-2 蛋白阳性表达主要位于肿瘤细胞胞浆中，少数间质细胞中偶见表达，在高倍镜下呈棕黄色颗粒，以强阳性和中度阳性为主，阳性表达率为 73.3%（50/65）。肺部良性病变支气管黏膜上皮内 mmp-2 可见弱阳性至中度阳性表达，阳性表达率为 37.5%（3/8）。正常支气管黏膜上皮多呈阴性表达，阳性表达率仅为 12.5%（1/8）。

正常肺组织和肺部良性病变组织中 maspin 蛋白和 mmp-2 的表达水平无显著性差异（$P>0.05$）；而在非小细胞肺癌组织中 maspin 蛋白和 mmp-2 的表达水平与正常肺组织和肺部良性病变组织均有显著差异（$P<0.05$）。

### 2.2 maspin 和 mmp-2 在 NSCLC 组织中的表达与临床病理特征的关系

2.2.1 maspin 蛋白的表达强度和 NSCLC 的临床病理特征的关系（见表 2）。

2.2.2 mmp-2 的表达强度与 NSCLC 临床病理特征的关系（见表 3）。

2.2.3 maspin 蛋白和 mmp-2 在 NSCLC 组织中表达强度间的相互关系（见表 4）。

肺癌组织中 maspin 与 mmp-2 两者表达强度之间用 Spearman 等级相关性分析显示，maspin 与 mmp-2 之间呈显著负相关（$r_s=-0.54$，$P=0.018$）。

表 1 maspin 和 mmp-2 在正常肺组织、肺部良性病变和 NSCLC 中表达特点

| 组别 | 例数 | Maspin 阳性（%） | mmp-2 阳性（%） |
|---|---|---|---|
| 正常肺组织 | 8 | 8（100%） | 1（12.5%） |
| 肺部良性病变 | 8 | 7（87.5%） | 3（37.5%） |
| NSCLC | 65 | 10（15.4%） | 50（73.3%） |

表 2 maspin 蛋白的表达强度和 NSCLC 的临床病理特征统计分析

| 病理因子 | 分组 | 总例数 | 阳性例数 | 阴性例数 | 阳性率(%) | $\chi^2$ | P 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 年龄 | >60 | 24 | 3 | 21 | 12.5 | 1.02 | >0.05 |
| | ≤60 | 41 | 7 | 34 | 17.1 | | |
| 性别 | 男 | 45 | 6 | 39 | 13.3 | 1.75 | >0.05 |
| | 女 | 20 | 4 | 16 | 20.0 | | |
| 组织学类型 | 鳞癌 | 33 | 5 | 28 | 15.1 | 1.15 | >0.05 |
| | 腺癌 | 32 | 5 | 27 | 15.6 | | |
| 组织分化程度 | 高 - 中分化 | 45 | 7 | 38 | 15.6 | 0.71 | >0.05 |
| | 低 - 未分化 | 20 | 3 | 27 | 15.0 | | |
| 肿瘤大小 | >5 cm | 39 | 6 | 33 | 15.4 | 0.02 | >0.05 |
| | ≤5 cm | 26 | 4 | 22 | 15.4 | | |
| 淋巴结转移 | 有 | 42 | 2 | 40 | 4.8 | 6.45 | <0.05 |
| | 无 | 23 | 8 | 15 | 34.8 | | |
| TNM 分期 | Ⅰ+Ⅱ | 51 | 7 | 44 | 13.8 | 1.14 | >0.05 |
| | Ⅲ+Ⅳ | 14 | 3 | 11 | 21.4 | | |

注:$P<0.05$ 差别具有显著性

表 3 mmp-2 的表达强度与 NSCLC 临床病理特征的关系

| 病理因子 | 分组 | 总例数 | 阳性例数 | 阴性例数 | 阳性率(%) | $\chi^2$ | P 值 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 年龄 | >60 | 24 | 19 | 5 | 79.2 | 0.15 | >0.05 |
| | ≤60 | 41 | 31 | 10 | 75.6 | | |
| 性别 | 男 | 45 | 33 | 12 | 73.3 | 2.11 | >0.05 |
| | 女 | 20 | 17 | 3 | 85.0 | | |
| 组织学类型 | 鳞癌 | 33 | 27 | 6 | 81.2 | 3.79 | >0.05 |
| | 腺癌 | 32 | 23 | 9 | 71.8 | | |
| 组织分化程度 | 高 - 中分化 | 45 | 36 | 9 | 80.0 | 3.04 | >0.05 |
| | 低 - 未分化 | 20 | 14 | 6 | 70.0 | | |
| 肿瘤大小 | >5 cm | 39 | 31 | 8 | 79.5 | 2.25 | >0.05 |
| | ≤5 cm | 26 | 19 | 7 | 73.1 | | |
| 淋巴结转 | 有 | 42 | 38 | 4 | 90.5 | 6.98 | <0.05 |
| | 无 | 23 | 12 | 11 | 52.2 | | |
| TNM 分期 | Ⅰ+Ⅱ | 51 | 42 | 9 | 82.4 | 5.32 | <0.05 |
| | Ⅲ+Ⅳ | 14 | 8 | 6 | 57.1 | | |

注:$P<0.05$ 差别具有显著性

表 4 maspin 蛋白和 mmp-2 在 NSCLC 组织中表达强度间的相互关系

| | maspin(+) | maspin(-) |
|---|---|---|
| mmp -2(+) | 2 | 8 |
| mmp-2(-) | 48 | 7 |

Spearman 等级相关性分析法,$r_s$= -0.54,$P$=0.036

## 3 讨 论

### 3.1 maspin 在 NSCLC 中的表达及意义

maspin 基因是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂,maspin 蛋白主要定位于细胞的胞浆,也可定位于细胞表面和胞核。maspin 的肿瘤抑制功能主要表现在以下几个方面:通过选择性控制 Bax/Bcl-2 的蛋白稳定性介导凋亡,抑制肿瘤生长[2];在整合素 β-1 的介导下参与黏着斑的形成,抑制肿瘤细胞的迁移和侵袭[3];maspin 可降低细胞表面尿激酶型纤溶酶原激活物(Urokinase type plasminogen activator,uPA)及其特异性受体(uPAR)水平,从而最终影响 uPA/uPAR 对细胞外基质及基底膜的降解[4,5];maspin 还可以通过调节小 G 蛋白 Rac1 和PAK1(p21- 活性激酶)的活性来抑制细胞的运动,通过磷酰肌醇-3 激酶(PI3K)和细胞外信号调节激酶(ERK)途径来调节细胞的粘附[6]。

研究表明,maspin 在多种正常细胞如乳腺、胃肠道、前列腺、皮肤的上皮细胞中高表达,而在相应的癌细胞中表达下调或缺失[7]。本研究从蛋白水平发现 maspin 蛋白在正常肺组织与肺部良性病变组织中高水平表达,阳性率分别为100%(8/8) 和 87.5%(7/8),而在 NSCLC 中则显著低表达或不表

达,其阳性率为 15.4%(10/65),两者差异有显著性,$P<0.05$。这与之前在其它组织中的研究相吻合。因此可以推测 maspin 蛋白的表达下调可能是导致肺癌发生的原因之一。并且本实验发现 maspin 蛋白表达水平与 NSCLC 的淋巴转移相关,因此 maspin 表达下调与肺癌恶化有关。已有研究表明 maspin 蛋白在恶性肿瘤细胞内的表达下调与下面几个因素有关:18q 染色体臂的缺失,基因表达下调或者基因沉默[8],maspin 启动子甲基化[9],组蛋白的去乙酰化[10]等。另有研究表明,maspin 的表达与突变型 P53 的水平负相关,这表明在体内,maspin 可能是 P53 的靶基因[11];内皮细胞中一氧化氮能诱导 maspin 的表达从而降低细胞的运动和侵袭能力,并增加细胞的凋亡[12]。但本研究仅从蛋白水平研究 maspin 基因在 NSCLC 中的作用,其 maspin 蛋白表达下调在 NSCLC 中的调控发生是在基因水平、转录水平还是转录后仍有待进一步的研究。

3.2 mmp-2 在 NSCLC 中的表达及意义

mmp-2 是基质金属蛋白酶家族中的明胶酶,能有效降解细胞外基质和基底膜,为肿瘤浸润和转移创造先决条件。动物实验证明,mmp-2 与大鼠肺癌晚期发生转移呈现正相关[13]。近年来研究发现,mmps 在肿瘤侵袭转移中的作用,除了降解 ECM 外,还能促进肿瘤血管生成,而后者是肿瘤生长、转移过程中的关键因素[14]。国内外大量实验研究均证实 mmp-2 与肺癌的侵袭转移及预后密切相关。本研究结果显示,mmp-2 在非小细胞肺癌中的表达强度与患者的性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤组织学类型、组织分化程度等因素无关。非小细胞肺癌组织中 mmp-2 的表达有淋巴结转移组高于无淋巴结转移组($P<0.05$),Ⅲ ~ Ⅳ期组高于 Ⅰ ~ Ⅱ期组($P<0.05$),提示 mmp-2 可能在 NSCLC 的侵袭过程中发挥重要作用。

3.3 maspin 蛋白与 mmp-2 在 NSCLC 中表达的相关性

maspin 蛋白和 mmp-2 分别属于丝氨酸蛋白酶抑制剂和基质金属蛋白酶类。我们研究发现两者在 NSCLC 中表达成负相关,这提示 maspin 蛋白对 mmp-2 可能有下调作用,但 maspin 如何调节 mmp-2 尚未见文献报道。目前研究证实,uPA 是调节 MMPs 活性的关键因素,MMPs 以酶原的形式分泌,在 uPA 的作用下被激活。也有研究表明:uPA 激活 mmp,开启 mmp 对细胞外基质的降解机制,主要是 uPA 通过酪氨酸激酶信号传导途径(包括 Src 和磷酰肌醇 -3 激酶),与整合素 β1 结合,激活 pro-mmp,从而调节 mmps 的活性。而 maspin 蛋白可以降低细胞表面 uPA 和 uPAR 的水平,抑制 uPA 的作用[15]。我们推测其机制可能是 maspin 通过下调 uPA 的表达,从而影响信号传导系统使 mmp-2 的表达下降,但其具体作用机制有待进一步探讨。

总之,我们的结果提示,maspin 蛋白表达下调和 mmp-2 蛋白的过表达在非小细胞肺癌发生、浸润转移中起重要作用,它们可以作为反映非小细胞肺癌病理生物学行为的指标。但两者者之间是如何调节的详细机制有待进一步研究。

## 参 考 文 献


[1] Kowalski M, Walczak A, Majsterek I. Matrix metalloproteinases (MMPs): modern molecular markers of open-angle glaucoma diagnosis and therapy[J]. Postepy Hig Med Dosw, 2008, 62: 582-592.

[2] Liu J, Yin S, Reddy N, et al.Bax mediates the apoptosis-sensitizing effect of maspin[J].Cancer Res, 2004, 64(5): 1703-1711.

[3] Celia N, Contreras A, Latha K, et al.Maspin is physically associated with [beta]1 integrin cell adhension in mammary epithelial cells[J].FASEB J, 2006, 20(9): 1510-1512.

[4] Biliran H Jr, Sheng S.Pleiotrophic inhibition of pericellular urokinase-type plasminogen activator system by endogenous tumor suppressive maspin[J]. Cancer Res, 2001, 61(24): 8676-8682.

[5] Yin S, Lockett J, Meng Y, et al.Maspin retards cell detachment via a novel interaction with the urokinase-type plasminogen activator urokinase type plasminogen activator receptor system[J].Cancer Res, 2006, 66(8): 4173-4181.

[6] Maekawa T, Shinagawa T, Sano Y, et al.Reduced levels of ATF-2 predispose mice to mammary tumors[J].Mol Cell Biol, 2007, 27(5): 1730-1744.

[7] Sood A K, Fletcher M S, Gruman L M, et al. The paradoxical expression of maspin in ovarian carcinoma[J].Clin Cancer Res, 2002, 8(9): 2924-2932.

[8] Friedrich MG, Toma MI, Petri S, et al.Expression of Maspin in non-muscle invasive bladder carcinoma: correlation with tumor an giogenesis and prognosis[J].Eur Urol, 2004, 45(6): 737-743.

[9] Fujisawa K, Maesawa C, Sato R, et al.Epigenetic status and aberrant expression of the rnaspin gene in human hepato-biliary tract carcinomas [J].Lab Invest, 2005, 85(2): 214-224.

[10] Villar-Garea A, Lmhof A.The analysis of histone modifications[J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1764(12): 1932-1939.

[11] Zou Z, Gao C, Nagaich AK, et al.p53 regulates the expression of the tumor suppressor gene maspin[J].J Biol Chem, 2000, 275(9): 6051-6054.

[12] Khalkhali-Ellis Z, Hendrixn M J.Nitricoxide regulation of maspin expression in normal mammary epithelial and breast cancer cells[J].Am J Pathol, 2003, 162(5): 1411-1417.

[13] 陈洪雷,刁路明,陈德基,等.大鼠肺癌侵袭和转移中明胶酶 A 及其抑制剂的动态表达[J].中华肿瘤杂志,2002,24(2):118-122.

[14] Still K, Robson CN, Autzen P, et al.Localization and quantification of mRNA for matrix metalloproteinases-2(MMP-2)and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases (TIMP-2) in human benign and malignant prostatic tissue[J]. Prostate, 2000, 42(1): 18-25.

[15] Festuccia C, Angelucci A, Gravina G, et al.Bombesin-dependent pro-MMP-9 activation in prostatic cancer cells requires beta1 integrin engagement [J].Exp Cell Res, 2002, 280(1): 1-11.


(责任编辑:关蕴良)