

· 基础研究 ·

透明质酸酶及基质金属蛋白酶-9 在人乳腺癌侵袭与转移中的意义^{*}

汪 毅^① 任国胜^② 石 远 王小毅 冉 亮

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘要】 目的 研究透明质酸酶(HAase)与基质金属蛋白酶-9(MMP-9)在人乳腺癌侵袭与转移中的意义。方法 应用组织匀浆、酶连吸附测定法及免疫组化等方法测定 HAase 和 MMP-9 在人乳腺癌中的表达和其病理特征比较。结果 ① 乳腺癌组织学分级 I、II、III 级组 HAase 的分别为 4.89 ± 2.55 、 8.03 ± 2.66 、 12.00 ± 3.96 mU/g ($n=10, 20, 3$), III 级组 > II 级组 > I 级组 ($P < 0.05$)。乳腺癌有腋淋巴结转移组 HAase 表达(8.27 ± 3.26 mU/g, $n=23$)明显高于无腋淋巴结转移组(5.53 ± 2.82 mU/g, $n=10$) ($t = -2.305$, $P = 0.028$)。② MMP-9 阳性率在淋巴结转移组为(78.3%, 18/23), 明显高于无淋巴结转移组(30.0%, 3/10) ($P = 0.016$)。③ MMP-9 阳性组($n=21$) HAase(8.57 ± 3.12) mU/g 明显高于阴性组($n=12$) (5.47 ± 2.85) mU/g ($t = 2.830$, $P = 0.008$)。结论 HAase 和 MMP-9 一样, 与人乳腺癌侵袭与转移有关。
【关键词】 乳腺癌; 透明质酸酶; 基质金属蛋白酶-9; 侵袭与转移
中图分类号: R737.9; R446.6 文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2006)09-0675-03

Expression of hyaluronidase and matrix metalloproteinase-9 in the invasion and metastasis of human breast cancer Wang Yi, Ren Guosheng*, Shi Yuan*, et al. * Department of General Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

【Abstract】 **Objective** To study the expression of hyaluronidase (HAase) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in the invasion and metastasis of human breast cancer. **Methods** The expression of HAase and MMP-9 in human breast cancer was detected using tissue homogenate preparing, enzyme-linked immunoadsorbent assay (ELSA), and immunohistochemistry examination. **Results** ① The levels of HAase were 4.89 ± 2.55 , 8.03 ± 2.66 , and 12.00 ± 3.96 mU/g in grade I, II, and III of breast cancer, respectively ($n = 10, 20, 3$), with significant differences between each other ($P < 0.05$). The HAase levels were significantly elevated in patients with axillary lymph node metastasis (8.27 ± 3.26 mU/g, $n = 23$) as compared with patients without metastasis (5.53 ± 2.82 mU/g, $n = 10$) ($t = -2.305$, $P = 0.028$). ② The positive rate of MMP-9 was significantly higher in patients with axillary lymph node metastasis (78.3%, 18/23) than patients without metastasis (30.0%, 3/10) ($P = 0.016$). ③ The expression of HAase was significantly greater in MMP-9 positive patients (8.57 ± 3.12 mU/g, $n = 21$) than in MMP-9 negative patients (5.47 ± 2.85 mU/g, $n = 12$) ($t = 2.830$, $P = 0.008$). **Conclusions** Both HAase and MMP-9 are associated with the invasion and metastasis of human breast cancer.
【Key Words】 Breast cancer; Hyaluronidase; Matrix metalloproteinase-9; Invasion and metastasis

透明质酸酶(hyaluronidase, HAase)是透明质酸(hyaluronic acid, HA)的降解酶,水解 2-N-乙酰氨基葡萄糖(GlcUA)和 D-葡萄糖醛酸(GlcUA)之间的 1,3-键,将 HA 分解成多个寡聚糖。HAase 与肿瘤侵袭与转移密切相关,它一方面能降低细胞间黏附,促进细胞外基质去聚合,以促进肿瘤细胞的迁移;另一方面通过降解 HA,刺激血管生成。在正常组织中,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)处于稳定、平衡的状态,大分子物质进行着缓慢的交换。在侵袭性癌细胞附近可以观察到基质的变化,提示癌细胞能够破坏 ECM。在恶性肿瘤中,许多破坏

ECM 蛋白的酶已被确认,其中基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)最为突出^[1]。MMPs 是一类与肿瘤的侵袭和转移关系十分密切的蛋白水解酶, MMP-9 是其中重要的一员,它以酶原的形式分泌,被激活之后,形成 IV 型胶原酶,降解、破坏靠近肿瘤表面细胞外基质的 IV、V 型胶原和明胶,然后肿瘤细胞沿着缺失的基底膜向周围组织浸润,最终导致肿瘤的浸润和转移。MMP-9 高表达的肿瘤细胞在侵袭、转移过程中突破各种屏障能力较高。本课题旨在通过测定人乳腺癌组织中 HAase 和 MMP-9 的表达,探讨 HAase 在人乳腺癌侵袭和转移

^{*} 基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号 30070292)
^① (中国医学科学院中国协和医科大学肿瘤医院腹外科在读博士,北京 100021)
^② 通信作者

中的作用。

1 临床资料与方法

1.1 一般资料

本组 33 例,均为女性,年龄 32~84 岁,平均 50 岁。浸润性导管癌 26 例,浸润性小叶癌 1 例,浸润性腺癌 1 例,导管内癌 1 例,黏液腺癌 1 例,典型髓样癌 1 例,乳头状腺癌 1 例,纤维瘤癌变 1 例。标本取材后立即置 -70℃ 低温冰箱保存备用。乳腺癌组织学分级参考 Scarff-Bloom-Richarson 分级法分为 I、II、III 级。

1.2 方法

1.2.1 试剂与仪器 透明质酸酶标准品(40 U/L)和碱性磷酸酶标记的透明质酸蛋白(HNa-PA)由法国鲁昂 Laboratoire d'Oncologie Moléculaire, center H, Becquerel 实验室惠赠,透明质酸、Tween-20 和 4-硝基苯磷酸钠(PNPP)购于美国 Sigma 公司。MMP-9 购于福州迈新生物技术发展公司。低温匀浆机购于德国 B. Braun Biotech International 公司。

1.2.2 匀浆液的制备 取组织块 150~200 mg,癌组织匀浆部分不含癌块中央区组织,切碎,放入匀浆杯,液氮冷冻 5 min 后匀浆,1350 r/min × 50 s,重复一次液氮冷冻和匀浆。加入超纯水制成匀浆液(超纯水的毫升数 = 5 × 组织块克数)。将制成的组织匀浆置 1.5 ml 离心管(EP 管),17 000 r/min,离心 20 min,弃沉淀,上清液储于 4℃ 冰箱备用测定 HAase 用。

1.2.3 HAase 的测定与计算 采用酶联吸附测定法(enzyme linked sorbent assay, ELISA)^[21]。以标准品的光密度(OD)为横坐标,HAase 活性(mU/L)为纵坐标,制定标准曲线。根据标准曲线求得样本的 HAase 活性(mU/L)。

组织中 HAase 的浓度(mU/g) = $\frac{\text{HAase 活性(mU/L)}}{0.2 \times 10^3 \text{ g/L (标本的浓度)}}$

标本的浓度 = $\frac{1 \text{ (组织块克数)}}{5 \text{ (超纯水的毫升数)}} \times 1\,000 = 0.2 \times 10^3 \text{ g/L}$ 。

1.2.4 MMP-9 的测定 采用免疫组化 S-P 法。每次染色流程均设有对照作为染色质量控制标准。阳性对照用试剂供应商提供的阳性对照片,阴性对照用来源相同的阳性片,以枸橼酸盐缓冲液代替一抗。所有对照均与试验标本在同时、同一条件下进行。MMP-9 阳性染色反应分级判断标准:以胞浆内出现棕黄色颗粒者为阳性,不出现者为阴性。随机计数 5 个高倍(×400)视野或 1 000 个以上细胞,按染色强度记分:0 分为无色,1 分为淡黄色,2 分为棕黄色。按阳性细胞所占百分比记分:0 分为阴性,1 分为阳性细胞 ≤ 10%,2 分为阳性细胞 11%~50%,3 分为阳性细胞 51%~75%,4 分为阳性细胞 > 75%。染色强度与阳性细胞所占百分比乘积 3~5 分记为(+),6~9 分记为(++),10~12 分为(+++)。6~12 分为高表达,6 分以下为低表达。

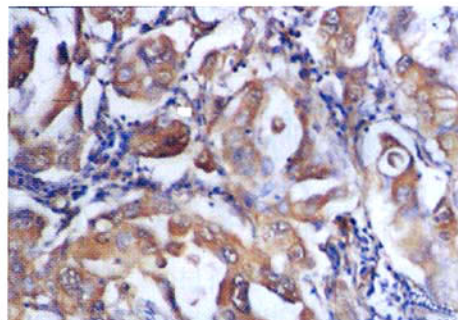


图 1 乳腺癌组织中 MMP-9 呈阳性表达 HRP 染色 ×400

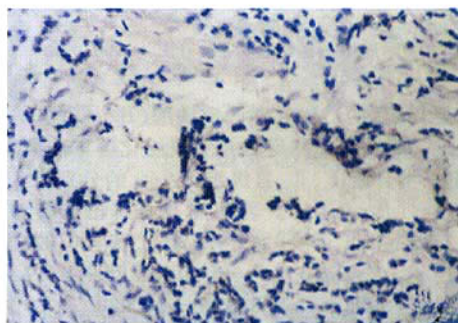


图 2 乳腺癌组织中 MMP-9 呈阴性表达 HRP 染色 ×400

1.3 统计学方法

应用 SPSS for Windows 10.0 统计软件进行方差分析、独立样本 *t* 检验或 Fisher's 检验,比较 HAase 和 MMP-9 的表达与临床及病理指标的关系。 $P < 0.05$ 认为具有统计学意义。

2 结果

2.1 HAase 的表达与临床病理特征的关系(表 1) 不同乳腺癌组织学分级中 HAase 的表达,III 级组 > II 级组 > I 级组,有显著性差异($P < 0.05$)。

乳腺癌有腋淋巴结转移组 HAase 表达明显高于无腋淋巴结转移组。HAase 的表达与乳腺癌病人的年龄和肿瘤大小无关。

2.2 MMP-9 表达与临床病理特征的关系(表 1)

淋巴结转移组 MMP-9 阳性率明显高于无淋巴结转移组($P = 0.016$)。MMP-9 表达与病人年龄、肿瘤组织学分级和大小无关。

2.3 乳腺癌 MMP-9 表达与 HAase 的关系

MMP-9 阳性组($n = 21$)HAase 表达(8.57 ± 3.12) mU/g 明显高于阴性组($n = 12$)(5.47 ± 2.85) mU/g $t = 2.830$ $P = 0.008$ 。

3 讨论

侵袭和转移是恶性肿瘤患者的主要死亡原因,其机制非常复杂,涉及许多生化过程。降解 ECM 和破坏基底膜是肿瘤转移过程中一个十分重要的环节^[1]。本课题旨在通过测定人乳腺癌组织中 HAase 和 MMP-9 的表达,探讨 HAase 对乳腺癌恶性行为的影响,为寻找阻断(预防)乳腺癌复发、转移和改善预后的新治疗手段提供理论依据。

表 1 乳腺癌组织中 HAase 的表达及 MMP-9 的阳性表达与临床病理特征的关系($\bar{x} \pm s$)

	HAase			MMP-9	
	(mU/g)	<i>F</i> (<i>t</i>)值	<i>P</i> 值	阳性	<i>P</i> 值**
年龄					
<40 岁(<i>n</i> = 5)	6.90 ± 1.51	<i>F</i> = 0.19	0.825	4(80%)	0.711
40 ~ 60 岁(<i>n</i> = 23)	7.39 ± 3.52			14(61%)	
>60 岁(<i>n</i> = 5)	8.22 ± 4.25			3(60%)	
肿瘤大小					
<3 cm(<i>n</i> = 6)	7.38 ± 3.91	<i>t</i> = -0.052	0.959	3(50%)	0.643
≥3 cm(<i>n</i> = 27)	7.46 ± 3.29			18(67%)	
组织学分级					
I 级(<i>n</i> = 10)	4.89 ± 2.55	<i>F</i> = 8.98	0.000 *	4(40%)	0.107
II 级(<i>n</i> = 20)	8.03 ± 2.66			14(70%)	
III 级(<i>n</i> = 3)	12.00 ± 3.96			3(100%)	
腋窝淋巴结转移					
无(<i>n</i> = 10)	5.53 ± 2.82	<i>t</i> = -2.305	0.028	3(30%)	0.016
有(<i>n</i> = 23)	8.27 ± 3.26			18(78%)	

* $q_{III-I} = 5.586$ $P < 0.05$ $q_{III-II} = 3.316$ $P < 0.05$ $q_{II-I} = 4.193$ $P < 0.05$; ** Fisher 's 检验

3.1 HAase 的表达

HAase 作为恶性肿瘤生物学因子 ,与肿瘤的侵袭与转移有关^[3]。例如分级高的前列腺癌组织所含 HAase 是正常成人前列腺和良性前列腺肥大的 10 倍以上 ,而分级低的前列腺癌组织中 HAase 呈中度升高(约 3 倍)^[4]。Lokeshwar 等^[5]也认为尿 HAase 主要在 G₂ 和 G₃ 级膀胱癌患者中升高。测定尿中的 HA-HAase 水平 ,在诊断膀胱癌中具有较高的敏感性与特异性^[6]。Bertrand 等^[7]通过测定乳腺癌标本原发灶和转移灶中 HAase 的含量 ,发现转移灶 HAase 表达水平 平均 37.36(24.06 ~ 99.63)mU/g 明显高于原发灶 平均 9.02(6.04 ~ 14.34)mU/g]。Victor 等^[8]报道 CAL51 细胞株向转移态过渡的典型特征是 HA 与 HAase 的表达显著增高。以上提示 HAase 的表达水平与肿瘤的转移与浸润有密切关系。

本研究中 HAase 表达乳腺癌组织学分级 III 级 > II 级 > I 级 ,乳腺癌腋窝淋巴结转移组 HAase 表达明显高于无腋窝淋巴结转移组($t = -2.305$, $P = 0.028$) ,提示人乳腺组织中 HAase 的表达与乳腺癌侵袭与转移相关。

3.2 MMP-9 的表达

MMP-9 亦称明胶酶 B ,是 IV 型胶原的主要降解酶 ,在胚胎发育、组织塑形中起着不可替代的作用。在病理情况下 ,MMP-9 通过降解 ECM 成分中的 IV 型胶原 ,使肿瘤细胞突破原发部位的正常基底膜而发生浸润 ,突破脉管周围的基底膜进入脉管系统而发生转移^[9]。

MMP-9 在皮肤癌、肺癌、甲状腺癌等组织中表达 ,与癌组织的浸润转移尤其是淋巴结转移密切相关。Torii 等^[10]测定 70 例胃癌和 130 例正常人 MMP-9 的表达 ,发现胃癌组织 MMP-9 表达高于正常组织 ,并与肿瘤大小、淋巴结转移和浸润深度相关。本研究发现乳腺癌腋窝淋巴结转移组 MMP-9 阳性表达率明显高于无腋窝淋巴结转移组($P = 0.016$) ,与文献报道一致^[11]。提示乳腺癌淋巴道转移与癌细胞 MMP-9 分泌有关 ,即 MMP-9 高表达者易发生淋巴结转移。

3.3 MMP-9 的表达与 HAase 的比较

HAase 与 MMP-9 同为 ECM 降解酶 ,HAase 使肿瘤细胞避免细胞间黏附 ,降解 ECM ,释放储存在 ECM 中的生长因子 ,诱导血管生成 ,从而促进瘤细胞浸润与转移。MMP-9 通过降解 ECM 成分中的 IV 型胶原使得肿瘤细胞突破原发部位正常的基底膜而发生浸润 ,突破脉管周围的基底膜进入脉管系统而发生转移。本研究中 ,MMP-9 阳性组 HAase 表达明显高于阴性组($t = 2.830$, $P = 0.008$) ,结果提示 HAase 与 MMP-9 一样 ,其表达与恶性肿瘤的浸润和转移相关。

参考文献

1 曾益新 ,主编. 肿瘤学. 北京 :人民卫生出版社 ,1999. 296.

2 Bertrand D ,Philippe D ,Catherine M , et al. Enzyme-linked hyaluronecton :a unique reagent for hyaluronan assay and tissue location and for hyaluronidase activity detection. Anal Biochem , 1995 229 35 - 41.

3 汪 毅 ,任国胜. 透明质酸酶及其在恶性肿瘤的转移与浸润中的作用. 实用肿瘤学杂志 2005 ,19(1) :155 - 158.

4 Lokeshwar VB ,Lokeshwar BL ,Pham HT , et al. Association of elevated levels of hyaluronidase ,a matrix-degrading enzyme ,with prostate cancer progression. Cancer Res 1995 56 651 - 657.

5 Lokeshwar VB ,Obek C ,Pham HT , et al. Urinary hyaluronic acid and hyaluron-idase markers for bladder cancer detection and evaluation of grade. J Urol 2000 163 348 - 356.

6 Hautmann S ,Toma M ,Lorenzo-Gomez MF ,et al. Immunocyt and the HA-HAase urine tests for the detection of bladder cancer :a side-by-side comparison. Eur Urol 2004 46(4) :466 - 471.

7 Bertrand P ,Girard N ,Duval C ,et al. Increased hyaluronidase levels in breast tumor metastases. Int J Cancer 1997 73 327 - 331.

8 Victor R ,Chauzy C ,Girard N , et al. Human breast-cancer metastasis formation in a nude-mouse model : studies of hyaluronidase hyaluronan and hyaluronan-binding sites in metastatic cells. Int J Cancer 1999 82 77 - 83.

9 姚广裕 ,杨名添. 基质金属蛋白酶与乳腺癌. 癌症 2002 21(9) : 1029 - 1034.

10 Torii A ,Kodera Y ,Uesaka K , et al. Plasma concentration of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer. Br J Surg 1997 84 133 - 136.

11 王丽辉 ,刘大渔 ,吕 申. 乳腺癌的淋巴道转移与癌细胞中 MMP-9 表达的相关性. 大连医科大学学报 2001 23(4) :264 - 266.

(收稿日期 2005 - 06 - 06)
(修回日期 2006 - 02 - 23)