

## · 实验研究 ·

# MMP-2/9 和Ⅳ型胶原蛋白与胃癌患者胃液芳香族氨基酸浓度变化的关系\*

刘 健 周丽雅\*\* 崔荣丽 金 珠 林三仁 张贺军 韩亚京 张 颖 尚惠茹 李松茹

(北京大学第三医院消化科, 北京 100191)

**【摘要】 目的** 探讨基质金属蛋白酶 2/9 (MMP-2/9) 和Ⅳ型胶原 (Col Ⅳ) 蛋白在胃癌组织中的表达及其与胃癌患者胃液芳香族氨基酸 (aromatic amino acids, AAAs) 浓度异常升高之间的关系。 **方法** 收集 2015 年 12 月 ~ 2016 年 8 月胃镜检查 120 例符合入排标准患者的胃黏膜组织和胃液标本。根据病理诊断结果分为胃癌组 (GC,  $n = 29$ ) 和胃良性疾病组 (NGD,  $n = 91$ )。应用免疫组织化学法和液相色谱串联质谱法对胃黏膜组织中 MMP-2/9 和 Col Ⅳ 蛋白的表达情况及胃液中 3 种 AAAs (酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸) 进行检测。比较 MMP-2/9 和 Col Ⅳ 蛋白在 GC 和 NGD 组间表达的差异, 并与胃液中 3 种 AAAs 的浓度进行相关性分析。 **结果** ① GC 组 MMP-2/9 蛋白的表达水平均显著高于 NGD 组, Col Ⅳ 蛋白的表达水平显著低于 NGD 组 ( $P$  均 = 0.000); MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平呈正相关关系 ( $\rho = 0.418, P = 0.000$ ), 二者均与 Col Ⅳ 蛋白的表达水平呈负相关关系 (MMP-2:  $\rho = -0.454, P = 0.000$ ; MMP-9:  $\rho = -0.383, P = 0.000$ )。② GC 组胃液 3 种 AAAs 浓度均显著高于 NGD 组 ( $P$  均 = 0.000)。③ 胃黏膜组织中 MMP-2/9 蛋白的表达水平与胃液中 3 种 AAAs 浓度均呈正相关关系 (MMP-2:  $\rho = 0.262, 0.295, 0.293, P = 0.004, 0.001, 0.001$ ; MMP-9:  $\rho = 0.442, 0.437, 0.400, P$  均 = 0.000), Col Ⅳ 蛋白的表达水平与胃液中 3 种 AAAs 浓度呈负相关关系 ( $\rho = -0.283, -0.280, -0.273, P = 0.002, 0.002, 0.003$ )。 **结论** 胃癌组织通过上调 MMP-2/9 蛋白的表达, 降解基底膜和细胞外基质中 Col Ⅳ 蛋白, 可能是引起胃癌患者胃液 AAAs 浓度异常升高的原因之一。

**【关键词】** 胃癌; 基质金属蛋白酶 2/9; Ⅳ型胶原; 芳香族氨基酸; 相关性分析

文献标识: A 文章编号: 1009-6604(2018)06-0535-07

doi: 10.3969/j.issn.1009-6604.2018.06.016

**Relations Between MMP-2/9 and Type Ⅳ Collagen and Aromatic Amino Acids Levels in Gastric Juice in Gastric Cancer Patients** Liu Jian, Zhou Liya, Cui Rongli, et al. Department of Gastroenterology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China

Corresponding author: Zhou Liya, E-mail: zhoumed@126.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-2/9 (MMP-2/9) and type Ⅳ collagen (Col Ⅳ) in gastric tissues and their relations with abnormal elevation of aromatic amino acids' (AAAs) concentrations in gastric juice in gastric cancer (GC) patients. **Methods** Gastric mucosal specimens and gastric juice samples were simultaneously collected from 29 GC patients and 91 non-neoplastic gastric disease (NGD) patients. The expression levels of MMP-2/9 and Col Ⅳ in gastric tissues were examined by immunohistochemical staining while the levels of AAAs (tyrosine, phenylalanine and tryptophan) in gastric juice were determined by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. The expression of MMP-2/9 and Col Ⅳ was compared between GC group and NGD group, and relation with levels of AAAs was evaluated by the Spearman correlation analysis. **Results** The expression intensity of MMP-2/9 in the GC group was significantly higher than that in the NGD group, while the expression of Col Ⅳ was markedly lower than that in the NGD group ( $P = 0.000$ ). Moreover, there was a positive correlation between the expression level of MMP-2 and MMP-9 ( $\rho = 0.418, P = 0.000$ ), but they were both negatively correlated with Col Ⅳ ( $\rho = -0.454, P = 0.000$ ;  $\rho = -0.383, P = 0.000$ ). The levels of AAAs in gastric juice were significantly higher in GC patients than those in NGD individuals ( $P = 0.000$ ). The expression levels of MMP-2/9 in gastric tissues were both positively correlated with the concentrations of AAAs in gastric juice (MMP-2:  $\rho = 0.262, 0.295, \text{ and } 0.293$ , respectively,  $P = 0.004, 0.001, \text{ and } 0.001$ , respectively; MMP-9:  $\rho = 0.442, 0.437, \text{ and } 0.400$ , respectively, all  $P = 0.000$ ), but the expression of Col Ⅳ was negatively correlated with them ( $\rho = -0.283, -0.280, \text{ and } -0.273$ , respectively,  $P = 0.002, 0.002, \text{ and } 0.003$ , respectively). **Conclusion** The overexpression of MMP-2/9 resulting in the degradation of Col Ⅳ in basement membrane and extracellular matrix may lead to the variation of AAAs' levels in gastric juice of GC patients.

\* 基金项目: 国家自然科学基金 (81672410); 北京市重点实验室 2015 年度科技创新基地培育与发展专项 (Z151100001615057)

\*\* 通讯作者, E-mail: zhoumed@126.com

**【Key Words】** Gastric cancer; Matrix metalloproteinase-2/9; Type IV collagen; Aromatic amino acid; Correlation analysis

针对胃癌(gastric cancer, GC)诊断的新方法,我课题组历经数十年的探索和研究,建立了基于胃液荧光光谱诊断和筛查胃癌的方法<sup>[1]</sup>,分离 3 种芳香族氨基酸(aromatic amino acids, AAAs)荧光标志物,即酪氨酸(tyrosine, Tyr)、苯丙氨酸(phenylalanine, Phe)、色氨酸(tryptophan, Trp),并分别应用液相色谱串联质谱(liquid chromatography-tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)和核磁共振波谱(nuclear magnetic resonance, NMR)的方法进行鉴定<sup>[2]</sup>。应用高效液相(high-performance liquid chromatography, HPLC)进行定量研究的结果表明,3 种胃液游离 AAAs 可以用于鉴别早期和进展期胃癌与胃良性病变<sup>[3]</sup>。上述研究成果得到国内外学者的认可<sup>[4,5]</sup>,并得到蛋白质组学研究领域国际权威期刊 Journal of Proteomics<sup>[6]</sup>和肿瘤学研究领域国际权威期刊 Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention<sup>[7]</sup>的大幅引用。

但胃癌患者胃液 AAAs 浓度异常升高的机制尚不明确。既往我课题组对这一现象的发生机制进行一系列探索,如参与细胞间 L 型氨基酸转运的 L 型氨基酸转运蛋白 1(LAT1),参与细胞内氨基酸代谢的酶如吡哆胺 2,3-双加氧酶(IDO)和单胺氧化酶(MAO),以及参与细胞内蛋白质降解/自噬相关的蛋白 SQSTM1/p62,但都因为上述蛋白在不同病理类型胃癌组织中的表达差异较大而无法解释各型胃癌患者胃液 AAAs 浓度均异常升高这一现象<sup>[8]</sup>。本研究旨在探索参与细胞外代谢的酶及其相关的蛋白,即基质金属蛋白酶 2/9(matrix metalloproteinase-2/9, MMP-2/9)和 IV 型胶原(type IV collagen, Col IV)蛋白,在胃癌组织中的表达情况及其与胃癌患者胃液 AAAs 浓度异常升高之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究经北京大学第三医院伦理委员会批准(IRB00006761-2016058)。

纳入标准:①因上腹不适等消化道症状就诊,行胃镜及胃黏膜活检;②年龄 $\geq 18$ 岁;③胃液中无食团、出血及胆汁反流。

排除标准:①经历过胃、食管或十二指肠手术或放化疗;②合并其他部位或血液系统恶性肿瘤;③合并外伤及严重基础性疾病;④孕妇或哺乳妇女。

在患者知情同意下,2015 年 12 月~2016 年 8 月共收集 120 例患者的胃黏膜组织(胃窦和胃体至少各 1 块)和胃液标本。肿瘤分级依据国际抗癌联盟(UICC)第 7 版胃癌 TNM 分期,组织学形态分型依据世界卫生组织(WHO)第 4 版胃癌分型,异型增

生(atypical hyperplasia, ATP)的诊断依据帕多瓦国际分类标准,慢性胃炎(chronic gastritis, CG)的诊断依据新悉尼系统标准。根据病理诊断结果分为胃癌(GC)组和胃良性病变(non-neoplastic gastric diseases, NGD)组。GC 组 29 例,年龄 31~84 岁,  $(60.2 \pm 13.6)$  岁;男 19 例,女 10 例;病理为管状腺癌 17 例,低分化腺癌 6 例,印戒细胞癌 4 例,黏液腺癌 2 例;早期 11 例(I A 期 10 例, I B 期 1 例),进展期 18 例(II 期 4 例, III 期 10 例, IV 期 4 例)。NGD 组 91 例;年龄 29~88 岁,  $(62.4 \pm 13.4)$  岁;男 35 例,女 56 例;病理为胃黏膜异型增生 46 例,胃黏膜萎缩/肠化 28 例,慢性浅表性胃炎 17 例。

### 1.2 方法

1.2.1 主要试剂和仪器 兔抗人 MMP-2 多克隆抗体(ZA-0331)、兔抗人 MMP-9 单克隆抗体(ZA-0562)、小鼠抗人 Col IV 单克隆抗体(ZM-0081)、山羊抗兔 IgG/HRP 聚合物(PV-6001)、山羊抗小鼠 IgG/HRP 聚合物(PV-6002)、胃蛋白酶消化液(ZLI-9013)、柠檬酸组织抗原修复液(pH 6.0)(ZLI-9065)、磷酸盐(phosphate buffered saline, PBS)缓冲液(ZLI-9065)、二氨基联苯胺(diaminobezidin, DAB)显色试剂盒(ZLI-9018)均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。甲醇(色谱纯)(美国 Fisher Scientific 公司),甲酸(色谱纯)(美国 Dikma 公司),3 种 AAAs 标准品(美国 Sigma 公司),3 种 AAAs 氘标记(英国 CIL 公司)。组织自动脱水机、包埋机、石蜡切片机、烘片机均产自德国 Leica 公司;生物显微镜产自日本 Nikon 公司;数字病理切片扫描仪产自日本 Harmatamo 公司。液相色谱仪(LC20-A)产自日本岛津公司;液相色谱串联质谱仪(QTRAP 5500)产自美国 Applied Biosystem 公司;一次性使用吸痰包产自中国苏州可邦高分子医疗器械有限公司。

1.2.2 组织标本处理及免疫组织化学法检测 MMP-2、MMP-9 和 Col IV 蛋白的表达 组织标本经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,4  $\mu\text{m}$  连续切片。一张常规 HE 染色,余做免疫组化染色。免疫组化染色采用 EnVision 二步法, MMP-2 和 MMP-9 蛋白采用高温高压组织抗原修复法, Col IV 蛋白采用胃酶消化法修复组织抗原,染色步骤按试剂盒说明进行, DAB 显色,以 PBS 代替一抗作为阴性对照。

由 2 位消化病理医师应用双盲法独立观察,每张切片随机选取至少 5 个高倍视野,对阳性染色细胞进行计数并评分,取平均值。若 2 位病理医师评分结果差异较大,则经讨论达成共识,或请第 3 位年资更高的病理医师协助完成。

MMP-2 和 MMP-9 蛋白阳性着色显示为细胞胞质呈淡黄色至棕褐色着色; Col IV 蛋白阳性着色显

示为胃腺体和脉管周围基底膜有连续、环形淡黄色至棕褐色颗粒沉着。MMP-2 和 MMP-9 蛋白阳性染色评分标准<sup>[9]</sup>:阳性细胞比例:无为 0 分,<10% 为 1 分,11% ~ 50% 为 2 分,51% ~ 75% 为 3 分,>75% 为 4 分;染色强度:无为 0 分,弱或淡黄色为 1 分,强或棕黄色为 2 分,极强或棕褐色为 3 分。阳性细胞比例×染色强度:0 ~ 3 分为(-),4 ~ 5 分为(+),6 ~ 8 分为(++),>8 分为(+++),(-)和(+)为阴性,(++)和(+++)为阳性。

Col IV 蛋白阳性染色评分标准<sup>[10]</sup>:根据腺体周围基底膜线性染色的完整性分为:(-)基底膜基本缺如:线状结构<10%,或呈碎片状表达,记 0 分;(+)基底膜大部缺损:线状结构介于 10% ~ 25%,呈细小的条索状表达,记 1 分;(++)基底膜基本存在:线状结构介于 25% ~ 50%,呈条索状表达,记 2 分;(+++)基底膜大部保留:线状结构介于 50% ~ 75%,呈断线状表达,记 3 分;(++++)基底膜基本完整:线状结构>75%,呈连续、环形表达,记 4 分。(-)和(+)为阴性;(++)、(+++)和(++++)为阳性。

1.2.3 胃液标本处理及 AAAs 浓度检测 禁食一夜,于胃镜下通过一次性吸痰管收集 5 ~ 10 ml 胃液。将收集到的胃液置于干冰上短期保存,3000 r/min 4 ℃离心 10 min,取上清,分装入 2 ml 冻存管,置于-80 ℃长期保存。检测前将胃液从超低温冰箱(-80 ℃)中取出,冰浴解冻;加入 100% 甲醇

(1:10)漩涡振荡(2 min)离心(15000 r/min,4 ℃,5 min),沉淀蛋白;取上清,加入纯化水(1:1 ~ 1:5)稀释。待高效液相色谱串联质谱分析。

应用梯度洗脱反相液相色谱分离 AAAs(流动相的选取,水相为 1/1000 甲酸,有机相为纯甲醇),使用电喷雾离子源(ESI+),多重离子反应监测(multiple reaction monitoring,MRM)模式检测 AAAs 质谱信号。使用 Phenomenex synergj Polar-RP 80A 色谱柱(长度 50 mm,内径 2.0 mm,填料粒径 4 μm),流动相 A 为甲醇,流动相 B 为 0.1% 甲酸水溶液,2.0 μl 进样。梯度洗脱,液相色谱反应条件设置:在 0 ~ 2 min 期间,流动相 A 所占的比例从 3% 逐渐升高到 50%;在 2 ~ 3 min 期间,流动相 A 所占的比例维持在 50%;在 3.0 ~ 3.1 min 期间,流动相 A 所占的比例从 50% 迅速下降到 3%;在 3.1 ~ 6.5 min 期间,流动相 A 所占的比例维持在 3%。流速 0.25 ml/min,进样量 2 μl,柱温 30 ℃,分析时长 6.5 min。质谱条件:电喷雾离子源,正离子模式检测(ESI+);离子喷射电压 3500 V;温度 550 ℃;源内气体 1(GS1,N<sub>2</sub>)压力 50 units;气体 2(GS2,N<sub>2</sub>)压力 40 units;气帘气压力 40 units;扫描方式为 MRM 模式;碰撞气(N<sub>2</sub>)压力 Media;每个氨基酸化合物的 MRM 条件见表 1。酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的色谱峰对应的保留时间分别为 1.0、1.4 和 2.9 min,质谱信号无干扰。

表 1 LC-MS/MS 检测芳香族化合物的 MRM 条件

成分	母离子(m/z)	子离子(m/z)	去簇电压(V)	入口电压(V)	碰撞能(V)	出口电压(V)
酪氨酸	182.0	165.0	70	10	13	13
酪氨酸-d2	184.2	138.1	70	10	13	13
苯丙氨酸	166.0	120.1	70	10	15	13
苯丙氨酸-d5	171.1	125.1	70	10	15	13
色氨酸	205.0	188.1	70	10	12	16
色氨酸-d8	213.2	195.0	70	10	12	16

LC-MS/MS:高效液相色谱串联质谱;MRM:多重离子反应监测;酪氨酸-d2:酪氨酸氘标记;苯丙氨酸-d5:苯丙氨酸氘标记;色氨酸-d8:色氨酸氘标记

1.2.4 LC-MS/MS 定量检测胃液中 AAAs 的标准曲线、回收率和准确度 使用双蒸水分别配制 8 个浓度(0.1、0.2、0.5、1.0、2.0、5.0、10.0 和 20.0 μg/ml)的标准液,每个浓度标准液内所含 L-酪氨酸、L-苯丙氨酸和 L-色氨酸的量均相等,-20 ℃保存,检测胃液 AAAs 浓度时取出用于标定建立 AAAs 定量的标准曲线。以待测化合物信号峰面积/内标峰面积的比值和化合物浓度作图,得到其标准曲线的线性关系。

标准曲线、线性回归系数以及线性区间分别为:酪氨酸,y(浓度)=1.79x(化合物峰与内标峰面积比值)+0.0236,r=0.9994,0.1 ~ 20.0 μg/ml;苯丙氨酸,y=1.14x+0.0171,r=0.9985,0.1 ~ 20.0

μg/ml;色氨酸,y=1.09x+0.0493,r=0.9988,0.1 ~ 20.0 μg/ml。加样回收率分别为:酪氨酸 101.6% ~ 101.8%,苯丙氨酸 98.5% ~ 107.3%,色氨酸 98.2% ~ 111.7%。精密度分别为:酪氨酸 2.63% ~ 7.04%,苯丙氨酸 1.32% ~ 8.93%,色氨酸,1.90% ~ 11.02%。以上结果均支持本定量胃液中 AAAs 的实验体系可靠稳定。若检测到的游离 AAAs 浓度超出标准曲线的浓度范围,则需要将原样本重新稀释后再进行检测。如果样本中游离 AAAs 浓度过低,超出检测下限,则将其视为零。

1.2.5 统计学分析 采用 SPSS20.0 进行统计学分析,正态分布的计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,不符合正态分布的计量资料用中位数(最小值 ~ 最大值)表示。

计数资料比较采用卡方检验,正态分布的计量资料比较采用独立样本 *t* 检验,不符合正态分布的计量资料和等级资料采用 Mann-Whitney *U* 检验,相关性分析采用 Spearman 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化染色结果

见图 1。GC 组中,MMP-9 在肿瘤组织中的表达以间质炎细胞表达为主,在肿瘤上皮细胞中仅有 3

例呈局灶的弱阳性表达,且这 3 例间质炎细胞中 MMP-9 均呈强阳性表达。MMP-9 蛋白的阳性表达与炎症活动关系密切,24 例 MMP-9 蛋白阳性表达的肿瘤组织均伴有炎症活动,其余 5 例 MMP-9 蛋白阴性表达的肿瘤组织均不伴有炎症活动。NGD 组中,MMP-9 蛋白在伴有炎症活动的 28 例胃良性病变组织中,11 例(39.3%)呈阳性表达,而在不伴有炎症活动的 63 例胃良性病变组织中,仅 12 例(19.0%)呈阳性表达。

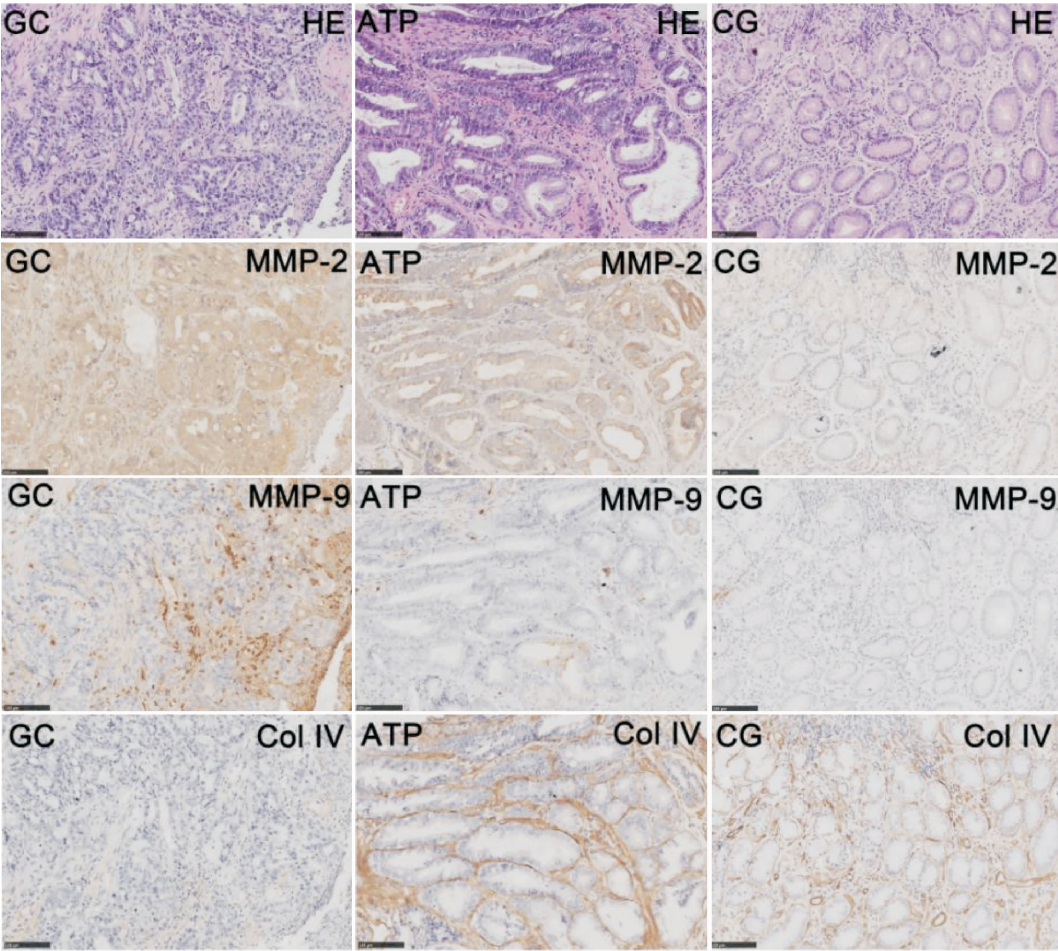


图 1 不同病理类型胃黏膜组织中 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白免疫组织化学染色 (×20),GC 为胃癌,ATP 为异型增生,CG 为慢性胃炎

GC 组中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白在肿瘤上皮细胞和间质炎细胞中的阳性表达率[89.7% (26/29) 和 82.8% (24/29)]显著高于 NGD 组[41.1% (37/90) 和 25.6% (23/90)]( $\chi^2 = 20.746, P = 0.000$ ;  $\chi^2 = 30.033, P = 0.000$ ),Col IV 蛋白的阳性表达率[10.3% (3/29)]显著低于 NGD 组[71.4% (65/91)]( $\chi^2 = 33.416, P = 0.000$ )(1 例慢性胃炎患者行 MMP-2 蛋白检测及 1 例异型增生患者行 MMP-9 蛋白检测时,胃窦胃体 2 个部位均脱片严重,未进行评分和统计)。应用免疫组织化学染色

评分表示蛋白的表达水平,GC 组 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平[中位数 8(3~12),9(4~12)]显著高于 NGD 组[4(0~8),4(0~9)]( $Z = -6.324, -6.588, P$  均 = 0.000),Col IV 蛋白的表达水平[0(0~3)]显著低于 NGD 组[2(0~4)]( $Z = -6.300, P = 0.000$ ),见图 2A。

2.2 胃液游离 AAAs 浓度检测结果

GC 组胃液中酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的浓度分别为 28.3 (1.08~323),37.9 (2.33~362) 和 10.1 (0.424~124)  $\mu\text{g/ml}$ ,均显著高于 NGD 组的

3.91 (0.155 ~ 54.5), 5.30 (0.118 ~ 93.0) 和 1.05 (0.044 ~ 75.5)  $\mu\text{g/ml}$  ( $Z = -5.205, -5.710, -5.631, P = 0.000$ ), 见图 2B。

### 2.3 胃黏膜组织中 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白表达水平的关系

应用免疫组化评分表示上述 3 种蛋白在胃黏膜组织中的表达水平, Spearman 相关性分析结果表明, MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平呈正相关关系 ( $\rho = 0.418, P = 0.000$ ), 二者均与 Col IV 蛋白表达水平呈负相关关系 ( $\rho = -0.454, P = 0.000; \rho = -0.383, P = 0.000$ ), 见图 3。

### 2.4 胃黏膜组织中 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白表达水平与胃液 AAAs 浓度间的关系

胃黏膜组织中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平与胃液中酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸浓度呈正相关关系 (MMP-2 与酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸的相关系数分别为  $\rho = 0.262, 0.295$  和  $0.293, P = 0.004, 0.001$  和  $0.001$ , MMP-9 分别为  $\rho = 0.442, 0.437$  和  $0.400, P$  均  $= 0.000$ ), 而 Col IV 蛋白的表达水平与胃液中酪氨酸、苯丙氨酸和色氨酸浓度之间呈负相关关系 ( $\rho = -0.283, -0.280$  和  $-0.273, P = 0.002, 0.002$  和  $0.003$ ), 见图 4。

## 3 讨论

基质金属蛋白酶 (MMPs) 是在 1962 年发现的一组锌离子依赖性内肽酶, 是由 28 种 MMP 构成的超家族, 各型 MMP 之间具有一定的特性。许多研究报道 MMP-2/9 通过降解基底膜和细胞外基质中的 Col IV 蛋白, 在胃癌发生和发展的过程中发挥重要作用<sup>[11,12]</sup>。因此, 本研究从细胞外代谢入手, 以 Col IV 蛋白为靶点, MMP-2/9 为切入点, 游离 AAAs 为代谢产物, 以期解释胃癌患者胃液 AAAs 浓度异常升高的原因。

本研究结果表明, 胃癌组织中 MMP-2 蛋白在肿瘤细胞胞浆和间质炎细胞中的表达均明显增强, 尤其是在肿瘤组织的浸润前缘, 阳性表达率为 89.7%, 这与既往研究报道相同<sup>[13,14]</sup>。但 MMP-9 蛋白在肿瘤细胞胞浆中几乎无表达或局灶呈弱阳性表达, 却在肿瘤间质的炎细胞中大量表达, 且表达水平与肿瘤组织中炎症的活动程度关系密切, 表达部位与肿瘤组织中的微血管分布相一致。偶见浸润到腺上皮细胞中的炎细胞表现为 MMP-9 蛋白阳性表达。本研究观察到的 MMP-9 蛋白表达模式与 Bergin 等<sup>[15]</sup>的报道一致, 即 MMP-9 蛋白在幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, *H. pylori*) 阳性的上皮固有层间质细胞中呈阳性表达, 而在幽门螺杆菌阴性的组织细胞中无表达; 幽门螺杆菌阳性的胃黏膜组织中 MMP-9 的活性是幽门螺杆菌阴性胃黏膜组织的 19 倍。此外, 本研究观察到绝大部分 MMP-9 蛋白于肿瘤间质的炎细胞中和癌巢周围的坏死渗出灶中大量

表达。这可能与胃癌组织常伴较严重的炎性反应, 或胃癌组织坏死后渗出的过程中会引起较严重的炎症反应有关。大量炎症细胞富集在肿瘤组织周围, 合成并分泌大量的 MMP-9 蛋白, 然后释放到细胞外基质中。也有可能是肿瘤细胞合成 MMP-9 蛋白后将其分泌到细胞外基质中, 被单核巨噬细胞或中性粒细胞吞噬, 进而表现为肿瘤细胞不表达或低表达, 而间质细胞表达或高表达 MMP-9 蛋白。总之, 炎症和肿瘤相互促进, 形成恶性循环。肿瘤细胞和间质细胞通过 MMP-9 等蛋白进行对话, 维持或打破原有的分子之间的平衡, 形成具有一定特征的肿瘤微环境。

本研究应用 LC-MS/MS 法检测, 观察到 GC 患者胃液中 3 种游离 AAAs 的浓度均显著高于 NGD, 与我课题组既往应用 HPLC 法检测的结果一致<sup>[2,3]</sup>。但是 HPLC 法检测一例至少需要 30 min, 检测效率较低, 且样本的前处理方法也比较复杂, 大大限制了其临床应用的可行性。本研究应用 LC-MS/MS 法的优势在于: ①前处理的方法相对简单, 不需要衍生, 直接沉淀蛋白稀释后即可进样, 显著缩短分离和分析的时间, 可以达到高通量检测的标准; ②同位素内标法灵敏度高, 因为与非同位素内标法相比, 该方法更能有效改善基质效应。因此, LC-MS/MS 法可以简便、快速、准确、高通量地检测胃液游离 AAAs 浓度。

MMP-2/9 以无活性的酶原形式分泌, 活化后能够降解细胞外基质中的胶原蛋白, 参与许多病理过程, 如在多种恶性肿瘤发生发展的过程中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。既往几项临床研究表明, MMP-2 和 MMP-9 可以促进恶性细胞的进展, 可能会促进肿瘤的生长、侵袭和转移, 因为其有降解细胞外基质和基底膜中 Col IV 蛋白的能力<sup>[17]</sup>。本研究结果表明, MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达水平呈正相关关系, 二者均与 Col IV 蛋白表达水平呈负相关关系, 这与既往国内外研究报道的结果一致。类似的是, Ruan 等<sup>[10]</sup>报道胃癌组织蛋白酶 D (cathepsin D, Cath-D) 的阳性表达率与基底膜中 Col IV 的连续性表达率呈负相关关系 ( $r = -0.33, P = 0.015$ )。总之, 肿瘤组织发生浸润转移一定伴有基底膜的破坏, 这一过程可以通过 MMP-2/9、Cath-D 和其他蛋白酶来实现。

本研究结果表明, 胃黏膜组织中 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白的表达水平与胃液 3 种 AAAs 浓度之间均存在一定的相关性 ( $P < 0.01$ )。具体来说, MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达水平与胃液 3 种 AAAs 浓度呈正相关关系, 而 Col IV 蛋白的表达水平与胃液 3 种 AAAs 浓度呈负相关关系。上述每一种蛋白与胃液 3 种 AAAs 间的相关系数都基本一致, 而 3 种蛋白中以 MMP-9 蛋白与胃液 AAAs 浓度之间的相关性最高。考虑与 MMP-2 蛋白相比, 除分解 Col IV 外, MMP-9 蛋白还可能通过促进新生血管生成, 以



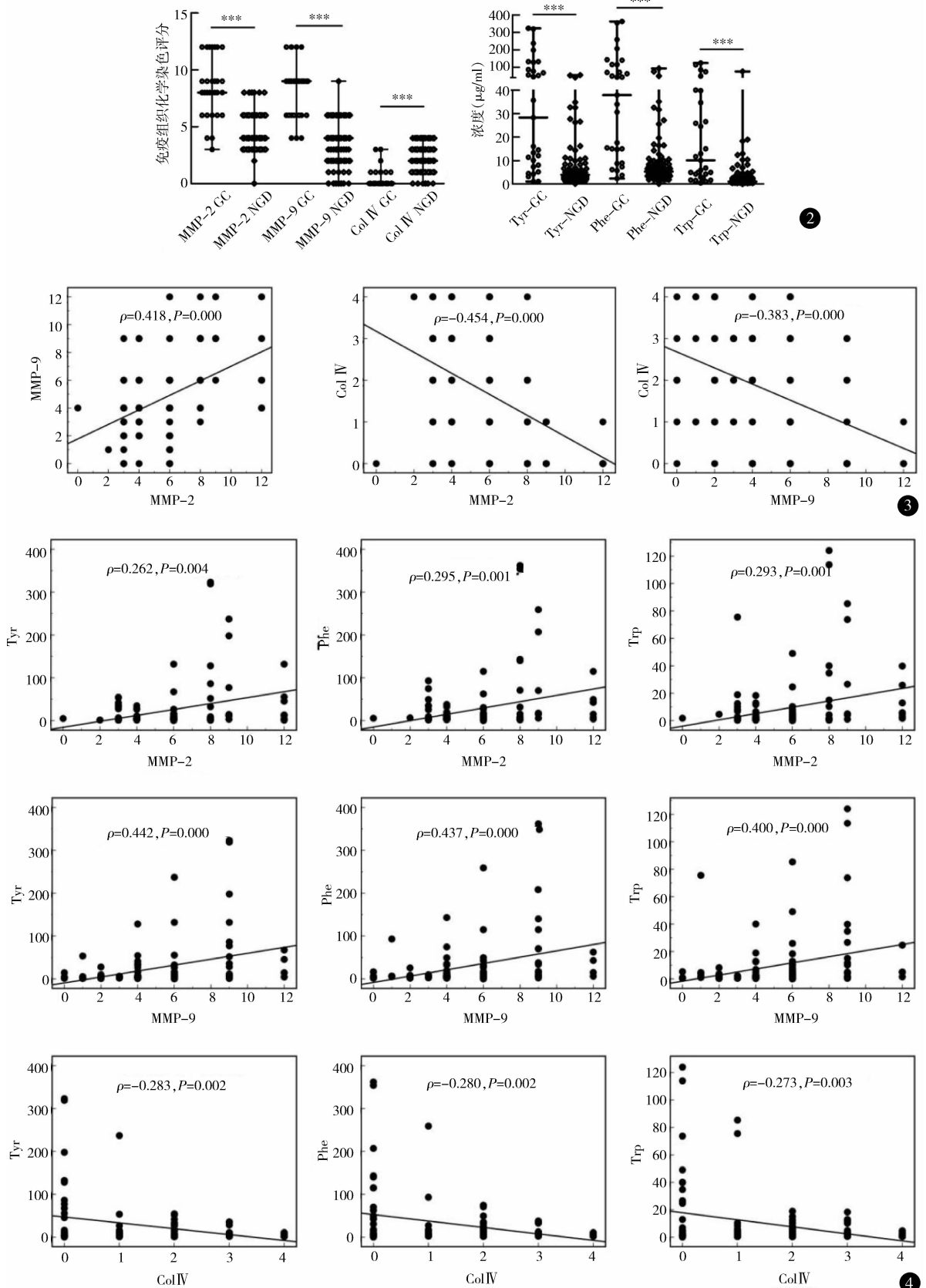


图 2 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白在胃黏膜组织中表达水平的散点图 (A); 胃液 3 种 AAAs 浓度的散点图 (B) (Tyr 为酪氨酸, Phe 为苯丙氨酸, Trp 为色氨酸, \*\*\* 表示 2 组间  $P=0.000$ ) 图 3 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白在胃黏膜组织中表达水平的相关性 ( $\rho$  为 Spearman 相关系数) 图 4 胃黏膜组织中 MMP-2/9 和 Col IV 蛋白表达水平与胃液 AAAs 浓度的相关性 ( $\rho$  为 Spearman 相关系数, Tyr 为酪氨酸, Phe 为苯丙氨酸, Trp 为色氨酸)

及增加胃黏膜和毛细血管的通透性,增加胃液 AAAs 浓度。也有可能 MMP-9 蛋白通过促进其他蛋白如 COX-2 等表达增强,从而发挥类似作用<sup>[18]</sup>。

总体来说,胃癌组织通过上调 MMP-2 和 MMP-9 蛋白的表达,降解基底膜和细胞外基质中 Col IV 蛋白,可能是胃癌患者胃液游离 AAAs 浓度异常升高的原因之一。

参考文献

1 刘健,闫秀娥,周丽雅,等.胃液固有荧光光谱在胃癌诊断中的应用进展.中国微创外科杂志,2018,18(1):64-67.

2 Deng K,Lin S,Zhou L,et al. Three aromatic amino acids in gastric juice as potential biomarkers for gastric malignancies. Anal Chim Acta,2011,694(1-2):100-107.

3 Deng K,Lin S,Zhou L,et al. High levels of aromatic amino acids in gastric juice during the early stages of gastric cancer progression. PLoS One,2012,7(11):e49434.

4 Huang L, Xu A. Detection of digestive malignancies and post-gastrectomy complications via gastrointestinal fluid examination. Front Med,2017,11(1):20-31.

5 Pinheiro Ddo R,Ferreira WA,Barros MB,et al. Perspectives on new biomarkers in gastric cancer: diagnostic and prognostic applications. World J Gastroenterol,2014,20(33):11574-11585.

6 Wu W,Chung MC. The gastric fluid proteome as a potential source of gastric cancer biomarkers. J Proteomics,2013,90:3-13.

7 Wiggins T,Kumar S,Markar SR,et al. Tyrosine, phenylalanine, and tryptophan in gastroesophageal malignancy: a systematic review. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,2015,24(1):32-38.

8 Li ZP,Li Y,Liu J,et al. Overexpression of cytoplasmic p62 protein is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. Int J Clin Exp Pathol,2016,9(8):8492-8498.

9 Hwang TL, Lee LY, Wang CC, et al. Claudin-4 expression is

associated with tumor invasion, MMP-2 and MMP-9 expression in gastric cancer. Exp Ther Med,2010,1(5):789-797.

10 Ruan HL,Hong RT,Xie HJ,et al. Significance of elevated levels of collagen type IV and hyaluronic acid in gastric juice and serum in gastric cancer and precancerous lesion. Dig Dis Sci,2011,56(7):2001-2008.

11 Wang HL,Zhou PY,Zhang Y,et al. Relationships between abnormal MMP2 expression and prognosis in gastric cancer:a meta-analysis of cohort studies. Cancer Biother Radiopharm,2014,29(4):166-172.

12 Chen J, Chen LJ, Zhou HC, et al. Prognostic value of matrix metalloproteinase-9 in gastric cancer: a meta-analysis. Hepatogastroenterology,2014,61(130):518-524.

13 Bornschein J,Seidel T,Langner C,et al. MMP2 and MMP7 at the invasive front of gastric cancer are not associated with mTOR expression. Diagn Pathol,2015,10:212.

14 Gurgel DC, Valença-Junior JT,Dornelas CA,et al. Immunoexpression of metalloproteinases 2 and 14 and TIMP-2 inhibitor in main types of primary gastric carcinomas and lymph node metastasis. Pathol Oncol Res,2015,21(1):73-81.

15 Bergin PJ, Anders E, Sicheng W, et al. Increased production of matrix metalloproteinases in Helicobacter pylori-associated human gastritis. Helicobacter,2004,9(3):201-210.

16 Brown GT,Murray GI. Current mechanistic insights into the roles of matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. J Pathol,2015,237(3):273-281.

17 Peng CW, Liu XL, Liu X, et al. Co-evolution of cancer microenvironment reveals distinctive patterns of gastric cancer invasion: laboratory evidence and clinical significance. J Transl Med,2010,8:101.

18 Mrena J,Wiksten JP,Nordling S, et al. MMP-2 but not MMP-9 associated with COX-2 and survival in gastric cancer. J Clin Pathol,2006,59(6):618-623.

(收稿日期:2017-12-29)

(修回日期:2018-03-14)

(责任编辑:王惠群)