

Mmp-1 和 Hif-1 α 在喉癌组织中的表达刘春丽¹, 张圣林¹, 刘吉娜¹, 石新华¹, 刘双¹, 王淑萍¹, 胡俊兰^{2*}

摘要 **目的** 研究基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1, Mmp-1)和缺氧诱导因子-1 α (Hypoxia inducible factor-1 α , Hif-1 α)蛋白在喉癌组织中的表达,探讨二者在喉癌发生发展中的作用及两者的相关性。**方法** 应用免疫组化法(SP法)检测 34 例喉癌组织、癌旁正常组织、15 例声带息肉组织中 Mmp-1、Hif-1 α 的表达。**结果** ① Mmp-1、Hif-1 α 蛋白在喉癌组织中的表达明显高于癌旁组织和息肉组织($P<0.01$)。癌旁组织和息肉组织间的表达差异无统计学意义($P>0.05$)。② Mmp-1、Hif-1 α 的表达与肿瘤病理分级、临床分期、淋巴结转移有关($P<0.05$),与患者的性别、年龄、吸烟量、肿瘤大小、临床分型无关($P>0.05$)。③ Mmp-1、Hif-1 α 在喉癌中的表达水平呈正相关。**结论** Mmp-1 和 Hif-1 α 在喉癌组织中的高表达与喉癌的发生、发展有关,对判断喉癌的恶性程度、病情进展有重要价值。

关键词 喉肿瘤; Mmp-1; Hif-1 α ; 免疫组化

中图分类号 R739.65 **文献标识码** A **文章编号** 1009-9727(2011)12-1433-03

Expression of matrix metalloproteinase-1 and hypoxia inducible factor-1 α in laryngeal carcinoma tissue and the clinical significance. LIU Chun-li, ZHANG Sheng-lin, LIU Ji-na et al. (1. Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde, 067000, Hebei, P. R. China; Corresponding author: Hu Junlan, E-mail: lchl9245@sina.com)

Abstract **Objective** To investigate the expression of matrix metalloproteinase-1 (Mmp-1) and hypoxia inducible factor-1 α (Hif-1 α) in laryngeal carcinoma and discuss their relevance and the roles in carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma. **Methods** Immunohistochemical technique was used to detect the expression of Mmp-1 and Hif-1 α protein in 34 tissues of laryngeal carcinoma and 34 para-carcinoma normal tissues, 15 cases of vocal cord polyps. **Results** The expression of Mmp-1 and Hif-1 α protein in laryngeal carcinoma tissues is obviously higher than that in para-carcinoma and in vocal cord polyps respectively ($P<0.01$). There was no significant difference between the expression of para-carcinoma and vocal cord polyps ($P>0.05$). The expression of Mmp-1 and Hif-1 α protein was not related to patients' age and sex, smoking history, tumor size, clinical classification ($P>0.05$), but to the pathological grade, clinical stage and lymph nodes metastasis ($P<0.05$). There was a positive correlation between the expression of Mmp-1 and Hif-1 α in laryngeal

基金项目 承德市科委课题(No.201121131)

作者单位 1. 河北承德医学院附属医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 承德 067000; 2. 河北医科大学第四医院耳鼻咽喉头颈外科, 河北 石家庄 050011

作者简介 刘春丽(1977~)女, 主治医师, 主要从事耳鼻咽喉科学的临床与教学。

* 通讯作者 E-mail: lchl9245@sina.com

脂平板和 S-MAC 琼脂平板进行分离, 用快速 MUG 试验进行筛查, 并用先进的 VITEK32 全自动微生物生化分析仪鉴定, 极大的提高了该菌鉴定的准确性。据资料^[4]报道, MUG 试验阴性的菌株, 能产生 Vero 毒素(志贺毒素)。我们使用自己建立并优化的多重 PCR, 对该分离菌进行毒素基因检测, 结果均检出 SLT1、SLT2 和侵袭相关基因, 与资料报道一致。本研究建立的 EHEC O157:H7 多重 PCR 检测方法, 具有快速、简便、耗时短、特异和敏感性高等优点, 为重大食物中毒疫情处理、诊治及流行病学调查提供了具有实际应用价值和广阔应用前景的技术手段。

为验证我们分离的 EHEC O157:H7 是否为有毒力的菌株, 我们做了小白鼠毒力试验, 结果能使小白鼠发病死亡, 说明该分离菌具有较强的毒力。所做的药敏试验可为军队和地方治疗 EHEC O157:H7 的感染提供重要依据。

参考文献:

- [1] Riley L W, Remis R S, Helgerson S D et al. Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype [J]. N Engl J Med, 1993, 308: 681-685.
- [2] 吴家林, 肖勇, 凌俊, 等. 肠出血性大肠杆菌 O157:H7 多重 PCR 快速检测研究[J]. 现代预防医学, 2009, 36(1): 117-119.
- [3] Feng P. Escherichia coli serotype O157:H7 [J]. Emerging Infect Dis, 1995, 2: 47.
- [4] 聂青和. 感染性腹泻 [M]. 第 1 版, 北京: 人民卫生出版社, 2000, 323-339.
- [5] 于恩庶. 肠出血性大肠杆菌感染 [M]. 新发现的传染病. 福州: 福建教育出版社, 1997, 6-19.

收稿日期 2011-06-24 编辑 符式刚

carcinoma. **Conclusion** Overexpression of Mmp-1 and Hif-1 α valuable for judgement of the malignant degree and progress of laryngeal carcinoma.was observed in laryngeal carcinoma. The high expression of Mmp-1 and Hif-1 α might contribute to the carcinogenesis and development of laryngeal carcinoma ,

Key words: Laryngeal carcinoma; Mmp-1; Hif-1 α ; Immunohistochemistry

浸润与转移是恶性肿瘤的主要生物学特征,也是影响治疗效果和患者预后的重要因素。研究表明,基底膜降解与促进浸润和转移有关。基质金属蛋白酶(Matrix metalloproteinases, Mmps)是降解细胞外基质的主要酶系。其中 Mmp-1 是第 1 个被定性的基质金属蛋白酶。可降解细胞外基质的所有蛋白成分。Hif-1 α 是目前发现的唯一能在特异性缺氧状态下发挥转录活性的转录因子,在肿瘤进展中起重要作用。本研究采用免疫组化(SP)法检测 Mmp-1、Hif-1 α 蛋白在喉癌中的表达情况,并探讨二者在喉癌发生、发展中的作用及其相关性,旨在为研究喉癌的发生发展提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料 34 例喉癌组织及其相应癌旁组织(距肿瘤切缘至少 0.5cm)、取自承德医学院附属医院(三甲医院)耳鼻咽喉头颈外科住院手术的原发喉癌患者,另取 15 例声带息肉患者的喉部息肉组织做对照。术前均未接受放、化疗,诊断均经病理学检查证实。其中男性 32 例,女性 2 例,年龄 44~78 岁,中位年龄 61 岁,癌肿<3cm 者 19 例,癌肿 \geq 3cm 者 15 例,有淋巴结转移的 10 例,无淋巴结转移的 24 例(有无淋巴结转移根据术后病理而定);病理学分级:高分化组 14 例,中分化组 11 例,低分化组 9 例;喉癌分型:声门上型 15 例,声门型 19 例;临床分期采用 TNM 分类分期标准:Ⅰ期 16 例,Ⅱ期 18 例。所有标本取材后立即用 10%中性甲醛固定,石蜡包埋,制成 5um 厚切片。

1.2 方法

1.2.1 主要试剂 鼠抗人 Mmp-1 单克隆抗体,鼠抗人 Hif-1 α 单克隆抗体均来源于美国 Santa Cruz 公司。SP 试剂盒及 DAB 显色剂均为福州迈新生物技术有限公司产品。

1.2.2 染色方法 采用免疫组织化学 SP 法,具体试验步骤按试剂盒说明书进行。每批切片染色均以 PBS 代替一抗做阴性对照, Mmp-1、Ets-1 用已知结果阳性的肺癌组织切片作为阳性对照。一抗稀释比例均为 1:100。

1.2.3 结果判定

1.2.3.1 根据阳性细胞数所占百分比及着色强度进行判断 阳性细胞所占的百分比计分及按染色强度判断参见文献^[1]。

1.2.3.2 图像分析 免疫组化定量分析采用 Mivnt 型多功能真彩病理图像分析系统进行各指标比值的测定。每张切片随机选取 3 个不连续高倍视野(\times 400) 测定其免疫阳性产物面积占视野面积比值,各取其平均值,即被视为该标本的平均表达强度。

1.3 统计方法 应用 SAS 6.12 for windows 进行统计分析。

2 结果

2.1 Mmp-1、Hif-1 α 蛋白在喉癌组织中的表达情况(见表 1)。

表 1 Mmp-1、Hif-1 α 在不同喉组织中的阳性表达率和平均表达强度

组别	例数	Mmp-1		Hif-1 α	
		阳性数(%)	$\bar{x}\pm s$	阳性数(%)	$\bar{x}\pm s$
喉癌组	34	28 (82.4)	0.0569 \pm 0.0506	26 (76.5)	0.0834 \pm 0.0687
癌旁组	34	10 (29.4) ^a	0.0230 \pm 0.0208 ^a	8 (23.5) ^a	0.0064 \pm 0.0037 ^a
息肉组	15	2 (13.3) ^b	0.0128 \pm 0.0106 ^b	2 (13.3) ^b	0.0050 \pm 0.0048 ^b

注:喉癌组与癌旁组比较,^aP<0.05,喉癌组与息肉组比较,^bP<0.05

Mmp-1 在喉鳞癌组织中的表达主要见于癌巢细胞中,阳性细胞主要是肿瘤细胞胞浆。阳性细胞呈棕黄色或黄褐色颗粒状(图 1)。Hif-1 α 阳性细胞同样为肿瘤细胞胞质出现棕黄色颗粒,部分细胞胞核着色(图 2)。

表 2 Mmp-1 和 Hif-1 α 表达与喉癌临床病理参数的关系

临床病理因素		例数	Mmp-1		Hif-1 α	
			阳性数(%)	$\bar{x}\pm s$	阳性数(%)	$\bar{x}\pm s$
淋巴结转移	有	10	10 (100.0)	0.1135 \pm 0.0444	10 (100.0)	0.1216 \pm 0.0759
	无	24	19 (79.2) ^a	0.0333 \pm 0.030 ^a	16 (66.7) ^a	0.0674 \pm 0.0587 ^a
临床分期	I~II 期	16	11 (68.8)	0.0254 \pm 0.0236	9 (56.3)	0.0595 \pm 0.0533
	III~IV 期	18	17 (94.4) ^a	0.0848 \pm 0.052 ^a	17 (94.4) ^a	0.1045 \pm 0.0737 ^a
病理分级	高分化	14	11 (78.6) ^a	0.0332 \pm 0.040 ^a	9 (64.3) ^a	0.0475 \pm 0.0465 ^a
	中分化	11	8 (72.7) ^b	0.0508 \pm 0.028 ^b	8 (72.7) ^b	0.0557 \pm 0.0318 ^b
	低分化	9	9 (100.0)	0.1010 \pm 0.0606	9 (100.0)	0.1751 \pm 0.0465
临床分型	声门上型	15	13 (86.7)	0.0742 \pm 0.0532	13 (86.7)	0.1008 \pm 0.0711
	声门型	19	15 (78.9)	0.0431 \pm 0.0387	13 (68.4)	0.0695 \pm 0.0537
肿瘤大小/cm	直径<3	19	15 (78.9)	0.0515 \pm 0.0427	13 (68.4)	0.0743 \pm 0.0517
	直径 \geq 3	15	13 (86.7)	0.0637 \pm 0.0540	13 (86.7)	0.0947 \pm 0.0753
吸烟史(支/日)	\leq 20	16	13 (81.3)	0.0483 \pm 0.0333	13 (68.4)	0.0768 \pm 0.0570
	>20	18	15 (83.3)	0.0645 \pm 0.0574	13 (86.7)	0.0892 \pm 0.0689
年龄/岁	<60	14	12 (85.7)	0.0602 \pm 0.0530	11 (78.6)	0.0847 \pm 0.0607
	\geq 60	20	16 (80.0)	0.0545 \pm 13.15	15 (75.0)	0.0824 \pm 0.0660
性别	男	32	26 (81.3)	0.0562 \pm 0.0490	25 (78.1)	0.0808 \pm 0.0613
	女	2	2 (100.0)	0.0674 \pm 0.0155	1 (100.0)	0.1239 \pm 0.1042

注:有转移与无转移比较,^a、^b期与^a、^b期比较,低分化与高分化比较,^aP<0.05,低分化与中分化比较,^bP<0.05。

2.2 Mmp-1 和 Hif-1 α 表达分别与喉癌临床病理因素的关系 (见表 2)。

Mmp-1、Hif-1 α 蛋白在喉癌组织中的表达与淋巴结转移、临床分期、病理分级有关($P<0.05$) ;与临床分型、肿瘤大小、吸烟史、年龄和性别无关($P>0.05$)。

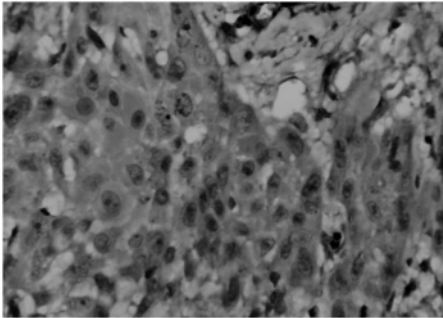


图 1 Mmp-1 在喉癌中的阳性表达 SP 法 $\times 400$

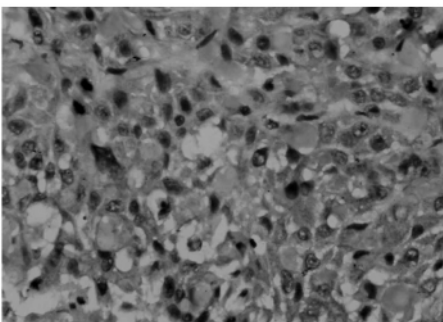


图 2 Hif-1 α 在喉癌中的阳性表达 SP 法 $\times 400$

2.3 喉癌中 Mmp-1 和 Hif-1 α 表达的相关性分析 喉癌组织中 Mmp-1 和 Hif-1 α 蛋白表达水平呈正相关($r=0.5523$ $P=0.0007$) ,直线回归方程为 $Y=0.418+0.7303X$ (图 3)。

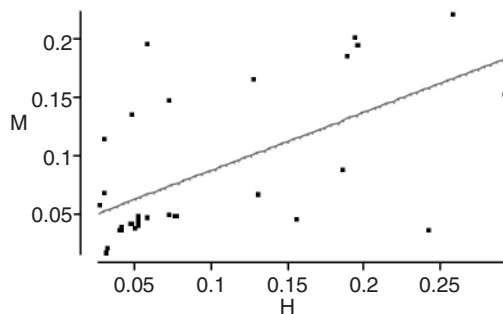


图 3 喉癌组织中 Mmp-1 和 Hif-1 α 蛋白表达水平呈正相关

3 讨论

Mmps 是一类具有降解细胞外基质和基底膜的蛋白水解酶,其中 Mmp-1 是间质胶原酶类的基质金属蛋白酶,与其他 Mmps 相比,它们具有更广泛的底物,可以降解 I、II、X 型胶原、蛋白多糖的核心蛋白和纤维连接蛋白等,参与细胞外间隙胶原纤维的代谢、许多非基质底物和细胞表面分子的分裂。目前在多种具有侵袭性的肿瘤中都发现有 MMP-1 的表达,如肝癌、大肠癌、肺癌及头颈部鳞癌等^[2]。本次实验研究结果表明,喉癌组织中 Mmp-1 表达明显高于癌旁正常组织及声带息肉组织,结果提示可能是肿瘤细胞的特异性作用诱导了 Mmp-1 在喉鳞癌细胞的表达。Mmp-1 对判断喉部病变良恶性具有参考价值。本结果还显示喉癌伴淋巴结转移者 Mmp-1 的表达明显高

于无淋巴结转移者,表明 Mmp-1 与喉癌的侵袭和转移有关。Mmp-1 在喉癌中表达同临床分型、肿瘤大小、吸烟史无关,与患者的年龄及性别无关,但与临床分期、病理分级有关。其研究结果与国内外相关文献报道一致^[3]。近年来关于 Mmp-1 基因启动序列多肽性研究成为热点^[4]。因此,喉癌细胞 Mmp-1 的多态性是一个危险因素,可以使肿瘤越来越具有侵袭和转移能力,也是 Mmp-1 表达升高的原因。因此早期人工下调 Mmp-1 蛋白表达,可望阻断喉癌的侵袭转移。

低氧是实体肿瘤物理微环境的基本特征之一。Hif-1 α 是氧调节亚基,又是功能亚基,决定 Hif-1 的活性,在缺氧、生长因子等因素的刺激下, Hif-1 α 与 Hif-1 β 结合为 Hif-1, Hif-1 通过识别、结合下游靶基因上游的缺氧反应元件,作用于结构基因的调控序列,发挥多种生物学功能。已有研究^[5]发现 Hif-1 α 在喉癌组织及其配对淋巴结中高表达。我们的结果也显示相对于喉部正常组织和良性病变, Hif-1 α 蛋白在喉癌组织中存在过度表达,提示 Hif-1 α 与喉癌的发生、发展密切相关。另外,本研究证实低分化的癌组织中 Hif-1 α 表达率高于高中分化组,淋巴结有转移组的表达强度高于淋巴结无转移组 ($P<0.05$) ,临床分期 ~ 期组亦明显高于 ~ 期组 ($P<0.05$) ,提示了 Hif-1 α 的表达可能是肿瘤快速增殖、侵袭和恶化的基因标志,与其它文献报道一致^[6]。

本实验经相关关系发现, Mmp-1 及 Hif-1 α 在喉癌中的表达呈正相关(r 为 0.5523)。证明 Hif-1 α 可引起 Mmps 的表达增加进而促进喉癌的转移。二者在喉癌的侵袭、转移过程中可能起着重要的协同效应,但确切作用机制尚需进一步证实。如能在蛋白水平上抑制 Hif-1 α 和 Mmp-1 的活性,将有助于改进恶性肿瘤的治疗方案,提高患者的生存率。

参考文献:

- [1] Gohji K, Okamoto M, Kitazawa S, et al. Heparanase protein and gene expression in bladder cancer[J]. J Urol 2001, 166: 1286-1290.
- [2] Peng B, Cao L, Wang W, et al. Polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases 1 and 3 and cancer risk: a meta-analysis of 50 case-control studies[J]. Mutagenesis 2010, 25(1): 41-48.
- [3] Shimizu Y, Kondo S, Shirai A, et al. A single nucleotide polymorphism in the matrix metalloproteinase-1 and interleukin-8 gene promoter predicts poor prognosis in tongue cancer [J]. Auris Nasus Larynx/Larynx 2008, 35: 381-389.
- [4] McColgan P, Sharma P. Polymorphisms of matrix metalloproteinases 1, 2, 3 and 9 and susceptibility to lung, breast and colorectal cancer in over 30,000 subjects[J]. Int J Cancer 2009, 125(6): 1473-1478.
- [5] Cabanillas R, Rodrigo JP, Secades P, et al. The relation between hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α expression with p53 expression and outcome in surgically treated supraglottic laryngeal cancer[J]. J Surg Oncol 2009, 99(6): 373-378.
- [6] Liang X, Yang D, Hu J, et al. Hypoxia inducible factor- α expression correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymphoangiogenesis/angiogenesis in oral squamous cell carcinoma[J]. Anticancer Res 2008, 28: 1659-1666.

收稿日期: 2011-09-25 编辑: 吴中菲