

· 论 著 ·

库肯勃瘤中 CD44v6、VEGF、MMP-2、
MMP-9 的表达及相关性研究*

高 颖 娄 阁

哈尔滨医科大学附属肿瘤医院妇科 (哈尔滨市 150040)

摘要 目的: 探讨 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 在库肯勃瘤及卵巢原发上皮癌中的表达及相关性。方法: 应用免疫组化 SP 法检测 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 在 20 例正常卵巢组织、38 例库肯勃瘤、45 例卵巢原发上皮癌中的表达情况。结果: CD44v6、VEGF 在卵巢原发上皮癌和库肯勃瘤组织中的表达显著高于正常卵巢组织 ($P < 0.05$); MMP-2、MMP-9 在正常卵巢组织中表达缺如; CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 在库肯勃瘤中阳性表达率明显高于卵巢原发上皮癌 ($P < 0.05$)。CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 在卵巢原发上皮癌、库肯勃瘤中, 任意两指标阳性表达均有正相关性 ($P < 0.05$)。结论: CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 均参与卵巢癌、胃癌、库肯勃瘤的发生、发展及演进过程, 并可为卵巢上皮癌、胃癌及库肯勃瘤的鉴别诊断提供一定依据。

关键词 卵巢肿瘤 Krukenberg 瘤 CD44v6 VEGF MMPs

中图分类号: R737.31 **文献标识码**: A **文章编号**: 1000-8179(2005)24-1381-05

Expression and Relativity Study of CD44v6, VEGF, MMP-2 and
MMP-9 in Krukenberg Tumor

Gao Ying Lou Ge

Department of Obstetrics and Gynecology, Tumor Hospital of Harbin Medical University, Harbin

Abstract Objective: To explore expression and relativity of CD44v6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 in Krukenberg and the primary epithelial ovarian carcinoma. Methods: The expressions of CD44v6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 were detected by immunohistochemistry S-P method in the 20 cases of normal ovarian tissues, 38 cases with Krukenberg tumor and 45 cases with primary epithelial ovarian carcinoma. Results: The expressions of CD44v6 and VEGF were significantly higher in primary epithelial ovarian carcinoma tissues and Krukenberg tumor tissues than in normal ovarian tissues ($P < 0.05$). The positive expression rates of MMP-2 and MMP-9 were zero in the normal ovarian tissues. The positive expression rates of CD44v6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 were remarkably higher in the Krukenberg tumor than in primary epithelial ovarian carcinoma ($P < 0.05$). Relativity has been observed for CD44v6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 each other in primary epithelial ovarian carcinomas and in Krukenberg tumors ($P < 0.05$). Conclusion: CD44v6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 were concerned with evolvement process for ovarian carcinoma, gastric cancer and Krukenberg tumor. Detection of CD44v6, VEGF, MMP-2 and MMP-9 may offer basis of diagnosis ovarian carcinoma, gastric cancer and Krukenberg tumor.

Key words Ovarian neoplasms Krukenberg tumor CD44v6
VEGF MMPs

* 本文课题受教育部出国留学人员基金(编号: [2003] 406) 和黑龙江省教育厅科研基金项目资助(编号: 9551138)

通讯作者: 娄阁 dr_lg911@163.com

胃癌是最常见的癌肿之一^[1]。胃癌器官转移率国内报道为64.2%，其中男性以肝转移最多(38.1%)，女性则以卵巢转移多见(43.6%)^[2]。源于胃肠道癌的卵巢转移亦称Krukenberg瘤，德国人库肯勃(Krukenberg)于1896年首先报道。此种转移癌属临床晚期，为高度恶性，预后极差，其发病及转移机制目前尚不十分清楚。

肿瘤的侵袭和转移是一复杂多步骤的肿瘤细胞与宿主细胞及基质间相互作用的过程。肿瘤转移过程涉及多种机制，其中癌细胞运动、粘附、瘤体内血管生成、癌细胞凋亡及转移相关基因与肿瘤浸润、转移有密切关系。VEGF是重要的血管形成因子，可诱导肿瘤血管形成，与肿瘤浸润和转移密切相关^[3]；CD44v6是粘附分子家族成员之一，是一种存在于细胞表面的跨膜糖蛋白，能介导淋巴细胞归巢并参与细胞-细胞间粘附，从而影响肿瘤细胞的侵袭转移能力^[4]；基质金属蛋白酶类(MMPs)是细胞外蛋白水解酶类中的一种，在多种恶性肿瘤的发生发展中起重要作用^[5]。我们应用免疫组化方法，探讨CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9在库肯勃瘤发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 标本

收集哈尔滨医科大学附属肿瘤医院1992年5月~2001年5月手术切除且资料完整的标本83例。其中卵巢原发上皮癌45例(浆液性腺癌15例，粘液性腺癌16例，其它类型14例)，库肯勃瘤38例，库肯勃瘤原发灶均为胃癌(从胃癌确诊至卵巢转移的时间小于2年者14例；同时发现者为20例；有4例间隔时间超过4年)。年龄20~75岁，中位年龄41岁。所有病例均经组织学或细胞学诊断，术前未经放疗或化疗。手术标本常规石蜡包埋。

1.2 试剂来源及方法

所有单克隆抗体均购自武汉博士德公司，采用免疫组化SP法，染色步骤按说明进行，用PBS替代一抗作阴性对照。

1.3 判定标准

光镜下见肿瘤细胞的胞浆中出现明确的棕黄色颗粒的细胞为阳性细胞。阳性强度分为：弱阳性为1分，强阳性为3分，介于二者之间为2分，同时计算阳性细胞的百分数，<5%计为0分，5%~15%计为1分，26%~50%计为2分，51%~75%计为3分，>75%计为4分，强度评分与阳性率评分乘积为该组织的免疫组化最后评分。

1.4 统计学处理

实验所得数据资料采用方差分析，计数资料采用 χ^2 检验，用Bivariate的pearson方法计算变量间的相关性，所有计算均用SPSS10.0软件包完成。

2 结果

2.1 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9的表达

CD44v6阳性染色颗粒主要位于肿瘤细胞膜上，部分表达于胞质中(图1B)，在卵巢正常组织和卵巢上皮癌、库肯勃瘤和胃癌中的阳性表达率存在显著性差异(卵巢正常组织 vs 卵巢原发上皮癌 $P<0.05$ ；卵巢正常组织 vs 库肯勃瘤 $P<0.05$ ；卵巢正常组织 vs 胃癌 $P<0.05$)。CD44v6的阳性表达与卵巢肿瘤的病理类型无关($P>0.05$)，而在库肯勃瘤中、低未分化之间有显著性差异($P<0.05$)。

VEGF阳性染色颗粒主要分布于细胞浆内(图1A)，在卵巢原发上皮癌、库肯勃瘤和胃癌组织中的阳性表达率显著高于正常卵巢组织(卵巢正常组织 vs 卵巢原发上皮癌 $P<0.05$ ；卵巢正常组织 vs 库肯勃瘤 $P<0.05$ ；卵巢正常组织 vs 胃癌 $P<0.05$)。VEGF在卵巢原发上皮癌与库肯勃瘤中阳性表达率有显著性差异($P<0.05$)；在卵巢癌各病理类型间无明显统计学差异($P>0.05$)，而在库肯勃瘤中、低未分化之间有显著性差异($P<0.05$)。

MMP-2和MMP-9的阳性染色颗粒表达位于细胞浆内(图1C、图1D)。在正常卵巢组织表达缺如(0/20)，库肯勃瘤的MMP-2和MMP-9阳性表达率显著高于卵巢原发上皮癌(MMP-2: $P<0.05$ ，MMP-9: $P<0.05$)。MMP-2和MMP-9阳性表达率与卵巢原发上皮癌病理类型无关，与库肯勃瘤的分化程度无关($P>0.05$)。

VEGF、CD44v6和MMP-2阳性表达率在胃癌和库肯勃瘤间差异不显著(VEGF: $P>0.05$ ；CD44v6: $P>0.05$ ；MMP-2: $P>0.05$)，库肯勃瘤MMP-9的阳性表达率显著高于胃癌($P<0.05$)。低分化胃癌MMP-2和MMP-9阳性表达率显著高于高中分化胃癌(MMP-2: $P<0.05$ ；MMP-9: $P<0.05$)。

2.2 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9表达的相关性

采用阳性表达程度评分的方法对检测指标进行打分，利用等级相关进行检验。结果表明，在库肯勃瘤中VEGF与CD44v6、MMP-2和MMP-9阳性表达程度均存在明显的相关性，CD44v6与MMP-2、MMP-9和MMP-2与MMP-9之间也存在显著相关性(表1)。在卵巢原发上皮癌中CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9表达之间均有显著相关性，其中

VEGF 与 MMP-9 以及 CD44v6 与 MMP-9 相关系数均大于 0.7。在胃癌原发灶中除 VEGF 与 MMP-2 表达以及 CD44v6 与 MMP-9 没有相关性外,其他各项检测之间均有显著相关性。尽管 VEGF 与 MMP-9 的相关系数仅为 0.366,且 VEGF 与 CD44v6 的相关系数仅为 0.385,但具有显著性(表 2)。

表 1 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 在卵巢上皮癌、库肯勃瘤和胃原发灶组织的表达

组别	n	CD44v6 阳性		VEGF 阳性		MMP-2 阳性		MMP-9 阳性	
		n	%	n	%	n	%	n	%
正常卵巢	20	2	10	1	5.0	—	—	—	—
卵巢上皮癌	45	16	35.6	14	31.1	8	17.8	6	13.3
浆液性腺癌	15	6	40	7	46.7	4	26.7	8	20.0
粘液性腺癌	16	4	25	3	18.8	2	12.5	2	12.5
其它类型	14	6	42.9	4	28.6	2	14.3	1	7.1
库肯勃瘤	38	27	71.1	27	71.1	31	81.6	31	81.6
中分化	14	9	64.3	10	71.4	12	85.6	10	71.4
低未分化	24	18	75	17	70.8	19	79.2	21	87.5
胃原发灶	38	30	78.9	27	65.8	25	65.8	23	60.5
高中分化	16	12	75	9	56.3	7	31.8	6	37.5
低未分化	22	18	81.8	16	72.7	18	81.8	17	77.3

表 2 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 表达的相关性

组别	CD44v6		MMP-2		MMP-9	
	r	P	r	P	r	P
库肯勃瘤						
VEGF	0.342	0.023	0.498	0	0.498	0
CD44v6	—	—	0.419	0.005	—	—
MMP-2	—	—	—	—	0.488	0.001
卵巢原发上皮癌						
VEGF	0.605	0.004	0.608	0.003	0.711	0
CD44v6	—	—	0.684	0.001	0.804	0
MMP-2	—	—	—	—	0.457	0.037
胃癌原发灶						
VEGF	0.366	0.046	—	—	0.385	0.035
CD44v6	—	—	0.456	0.011	—	—
MMP-2	—	—	—	—	0.439	0.015

B: CD44v6 低分化

A: VEGF 低分化

C: MMP-2 低分化

D: MMP-9 中分化

图1 库肯勃瘤组织中 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 的表达

3 讨论

研究表明, CD44v6 的高表达与卵巢癌恶性进展相关^[6]。在本实验中 CD44v6 在正常卵巢组织中低表达, 在卵巢上皮癌及库肯勃瘤中的表达高于正常卵巢组织 ($P<0.05$), 提示 CD44v6 阳性表达是恶性卵巢上皮癌的特征, 与卵巢肿瘤的恶性行为有关, 并与卵巢癌形成、生长和转移密切相关。

众多研究显示 CD44v6 的过量表达与多种肿瘤的发生、发展、浸润和转移的关系密切^[7]。本研究结果显示 CD44v6 在原发卵巢上皮癌和库肯勃瘤之间有显著性差异 ($P<0.05$), 在胃癌原发灶中亦有高表达 (78.9%), 说明 CD44v6 的高表达可能使癌细胞产生侵袭表型, 以利于癌细胞的转移, 与胃癌的远处转移密切相关。

VEGF 是目前公认主要促进血管形成的因子之一^[8,9]。VEGF 在卵巢癌患者血清以及癌组织中高表达, 与卵巢癌恶性进展、预后相关^[10]。在实验中 VEGF 在正常卵巢组织中低表达, 在卵巢原发上皮癌及库肯勃瘤中的表达高于正常卵巢组织 ($P<0.05$), 说明 VEGF 高水平表达与卵巢癌形成、生长和转移密切相关。

VEGF 促进肿瘤转移已在大量实验研究中得到了证实。研究发现, VEGF 在胃癌组织中呈高表达水平, 与胃癌的高侵袭性有关, 可作为胃癌预后不良的指标^[11]。VEGF 在卵巢原发上皮癌与库肯勃瘤间有显著性差异 ($P<0.05$), 在卵巢粘液性及混合性上皮癌与库肯勃瘤中、低未分化之间有显著性差异 ($P<0.05$); VEGF 在胃癌原发灶中亦有高表达, 提示 VEGF 可促进肿瘤的转移, 在肿瘤转移过程中起关键作用, 参与肿瘤转移灶的形成。Takahashi 等^[12]发现转移的结肠癌中 VEGF 的表达较无转移者明显增高, 推测 VEGF 的表达与结肠癌的转移关系密切, 同时在膀胱癌、肺癌及乳腺癌等实验研究中得到了相

似的结论, 均与本研究所显示的结果一致。

肿瘤细胞在侵袭转移过程中必须破坏细胞外基质(EMC)。在参与破坏 EMC 的酶类中 MMP 是主要的直接作用者, 而其中 MMP-2 (Mr: 72000) 和 MMP-9 (Mr: 92000), 又称 IV 型胶原酶或明胶酶 A 和明胶酶 B, 与肿瘤侵袭转移的关系最为密切^[13,14]。

在实验中 MMP-2、MMP-9 在正常卵巢组织中表达缺失, 卵巢原发上皮癌中表达较低, 可能与标本保存时间过长, 染色结果不理想有关。但从中可以看出, MMP-2、MMP-9 与卵巢肿瘤的浸润和转移关系密切。MMP-2、MMP-9 在恶性肿瘤组织中表达高于正常组织, 且二者在库肯勃瘤与卵巢原发上皮癌中的表达均有显著性差异 ($P<0.05$), 二者在胃癌中亦有高表达, 提示 MMP-2、MMP-9 可促进肿瘤的浸润和转移, 参与了胃癌的远处转移。文献报道, 许多恶性肿瘤中 MMP-2、MMP-9 的表达与其侵袭和转移有关^[15], MMP-2、MMP-9 高表达可能是恶性肿瘤细胞高侵袭和高转移的分子基础。MMP-2、MMP-9 在肿瘤组织中过度表达可提示肿瘤已发生侵袭和转移。

在实验中 MMP-2 在库肯勃瘤中、低未分化之间的表达无显著性差异 ($P>0.05$), 说明 MMP-2 与库肯勃瘤的分化程度无关, 有关这方面的结论, 还需进一步研究探讨。我们发现, MMP-2 在胃癌原发灶中分化与低分化之间有显著性差异 ($P<0.05$), 这与众多文献报道不完全一致, 还需进一步验证。

恶性肿瘤细胞从原发部位到达继发器官形成转移灶是个复杂的连续过程, 可分为: 粘附、降解、运动。整个过程有多种基因产物参与, 它们在不同时段、不同部位协同参与对转移灶的形成起着相当重要的作用。在实验中 CD44v6、VEGF、MMP-2、MMP-9 在卵巢原发上皮癌、库肯勃瘤中, 任意两指标阳性表达均有正相关性 ($P<0.05$)。可以说明上述因子均参与了肿瘤的侵袭转移过程, 在库肯勃瘤的转移机制中发挥重要作用, 提示肿瘤的侵袭转移是一复杂的多步骤的肿瘤细胞与宿主细胞及基质间相互作用的过程。

参考文献

- 1 Zhao GH, Li TC, Shi LH, et al. Relationship between inactivation of p16 gene and gastric carcinoma [J]. World J Gastroenterol, 2003, 9(5):905~909
- 2 全国胃癌病理协作组. 360 例胃癌尸检材料病理学研究[J]. 中华病理学杂志, 1983, 12(2):124~128
- 3 Conti CJ. Vascular endothelial growth factor: regulation in the mouse skin carcinogenesis model and use in antiangiogenesis cancer therapy[J]. Oncologist, 2002, 7(Suppl 3):4~11
- 4 Junglin B, Menges M, Goebel R, et al. Expression of CD44v6 has

- no prognostic value in patients with colorectal cancer [J]. Z Gastroenterol, 2002, 40(4):229~233
- 5 Waas ET, Lomme RM, DeGroot J, et al. Tissue levels of active matrix metalloproteinase-2 and -9 in colorectal cancer [J]. Br J Cancer, 2002, 86(12):1876~1883
- 6 李巨,刘佳,卢海鸥,等. 卵巢肿瘤中 CD44 变异型的免疫组织化学分析[J]. 中国肿瘤临床,1998, 25(10):738~741
- 7 Yamaguchi A, Goi T, Yu J, et al. Expression of CD44v6 in advanced gastric cancer and its relationship to hematogenous metastasis and longterm prognosis[J]. J Surg Oncol, 2002, 79(4): 230~235
- 8 Giavazzi R, Sennino B, Coltrini D, et al. Distinct role of fibroblast growth factor-2 and vascular endothelial growth factor on tumor growth and angiogenesis [J]. Am J Pathol, 2003, 162 (6): 1913~1926
- 9 Taraboletti G, Poli M, Dossi R, et al. Antiangiogenic activity of apolidine, a new agent of marine origin [J]. Br J Cancer, 2004, 90 (12):2418~2424
- 10 Gadducci A, Viacava P, Cosio S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in primary tumors and peritoneal metastases from patients with advanced ovarian carcinoma [J]. Anticancer Res, 2003, 23(3C):3001~3008
- 11 Linderholm BK, Lindh B, Beckman L, et al. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers[J]. Clin Breast Cancer, 2003, 4(5):340~347
- 12 Kabashima S, Msehara Y, Kakeji Y, et al. Clinicopathological features and overexpression of matrix metalloproteinases in intramucosal gastric carcinoma with lymph node metastasis[J]. Clin Cancer Res, 2000, 6(9):3581~3584
- 13 Hirvonen R, Talvensaari-Mattila A, Paakko P, et al. Matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in T (1-2) NO breast carcinoma [J]. Breast Cancer Res Treat, 2003, 77(1):85~91
- 14 Takahashi Y, Kitadai Y, Ellis LM, et al. Multiparametric in situ mRNA Hybridization Analysis of Gastric Biopsies Predicts Lymph Node Metastasis in Patients with Gastric Carcinoma [J]. Jpn J Cancer Res, 2002, 93(11):1258~1265
- 15 Wang L, Zhang LH, Li YL, et al. Expression of MMP-9 and MMP-9 mRNA in gastric carcinoma and its correlation with angiogenesis[J]. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2003, 83(9):782~786

(2005-01-27 收稿)

(2005-08-25 修回)

(董恒磊校对)

会 讯

为展示我国外科各专业领域近年来的新进展、新成果,中华医学会外科学分会实验外科学组定于2006年4月在石家庄召开中华医学会2006中国实验外科暨肿瘤外科论坛。本次会议将邀请外科学界院士和知名专家作专题演讲。凡参会者均颁发国家继续教育学分证书和中华医学会论文证书。现将征集论文的有关事宜通知如下:

1) 征文内容: (1) 外科基础(休克、感染、创伤、移植、营养、监护等)研究; (2) 肿瘤外科的临床研究、实验研究; (3) 血管、甲状腺、乳腺、肝胆胰脾胃肠、腹壁等的临床研究、实验研究; (4) 外科各专业领域的新理论、新技术、新方法; (5) 实验动物和动物模型; (6) 其他。

2) 征文要求: (1) 论文请寄全文及800字以内的摘要各1份(自留底稿)。摘要应包括文题,作者单位,邮编,姓名及论文目的、方法、结果、结论等。无摘要者恕不受理。(2) 论文要求科学性强、数据可靠、重点突出、文字精练。论文需由作者所在单位审查盖章同意,并请在信封正面注明“会议征文”字样; (3) 欢迎在基层医院临床一线工作的外科医师踊跃投稿,介绍解决临床疑难问题的工作经验; (4) 征文截稿日期:2005年12月20日; (5) 来稿请寄:石家庄市和平西路215号河北医科大学附属医院第二医院外科吕海涛、张建生医师收; 邮政编码:050000; 电话:0311-87222283。