

组织微阵列技术研究肿瘤转移相关基因 在鼻咽癌中的表达与临床意义*

范松青^{1,2)} 张文玲¹⁾ 徐丽娜²⁾ 周艳宏¹⁾ 李桂源^{1)**}

(¹⁾中南大学肿瘤研究所, 长沙 410078; ²⁾中南大学湘雅二医院病理科, 长沙 410011)

摘要 利用高通量组织微阵列结合免疫组化检测 MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin、nm23-H1、E-cad 和 TIMP-2 在鼻咽癌组织中的蛋白质表达, 探讨肿瘤转移相关基因异常表达在鼻咽癌侵袭转移中的作用, 筛选鼻咽癌转移相关分子标志物。结果发现, 鼻咽癌组织存在 MT1-MMP、Ezrin 蛋白高表达($P < 0.01$)和 nm23-H1、TIMP-2 蛋白低表达($P < 0.05$)。临床 II 期、III 期和 IV 期鼻咽癌和淋巴结转移鼻咽癌中 MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白阳性表达显著高于临床 I 期鼻咽癌和无转移癌($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但临床 II 期、III 期和 IV 期鼻咽癌和淋巴结转移鼻咽癌中 nm23-H1 蛋白的阳性表达显著低于临床 I 期鼻咽癌和无转移癌($P < 0.05$)。鼻咽癌组织中 MT1-MMP 与 MT2-MMP ($r = 0.308$, $P < 0.001$), nm23-H1 与 E-cad ($r = 0.167$, $P < 0.05$) 及 TIMP-2 ($r = 0.279$, $P = 0.001$), E-cad 与 TIMP-2 ($r = 0.279$, $P = 0.001$) 的蛋白质表达呈显著正相关。MT1-MMP 与 E-cad ($r = -0.188$, $P < 0.05$) 及 TIMP-2 ($r = -0.233$, $P < 0.05$), Ezrin 与 E-cad ($r = -0.204$, $P < 0.05$) 的蛋白质表达呈显著性负相关。聚类分析显示, 鼻咽癌 MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白共同阳性表达显著高于慢性炎性鼻咽上皮($P < 0.05$), 但 nm23-H1、E-cad 和 TIMP-2 蛋白在鼻咽癌组织中的共同阴性显著高于癌旁上皮和慢性炎性鼻咽上皮($P < 0.05$, $P < 0.01$)。多因素分析和有效性评估发现, MT1-MMP 蛋白能较好地独立预测鼻咽癌淋巴结转移和临床进展。上述研究结果提示, 多个肿瘤转移基因的蛋白质高表达, 转移抑制基因的低表达和这些基因的蛋白质表达失衡在鼻咽癌淋巴结转移和临床进展过程中起重要作用。MT1-MMP 蛋白可作为预测鼻咽癌淋巴结转移的较好分子标志。

关键词 肿瘤转移相关基因, 鼻咽癌, 组织微阵列, 免疫组化
学科分类号 R730.2

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00440

鼻咽癌易发生颈部淋巴结转移, 但其侵袭、转移的分子机制仍未完全阐明^[1]。基质金属蛋白酶与基质金属抑制剂之间的失衡, 肿瘤转移基因的激活和转移抑制基因的失表达在鼻咽癌的侵袭转移中起重要作用^[1~4], 但缺乏同时检测分析这些肿瘤转移相关基因在大样本量鼻咽癌组织中的蛋白质表达与其侵袭转移关系的研究。组织微阵列为大规模、高通量研究多个基因在鼻咽癌组织中蛋白质表达提供了新的工具^[5,6]。基于上述目的, 本研究利用前期实验已制作的鼻咽癌组织微阵列切片^[5,6], 免疫组化检测膜型基质金属蛋白酶 -1(membrane type1-matrix metalloproteinase, MT1-MMP)即基质金属蛋白酶 14(matrix metalloproteinase 14, MMP-14)、膜型基质金属蛋白酶 -2(membrane type2-matrix metalloproteinase, MT2-MMP)即基质金属蛋白酶 15(matrix metalloproteinase 15, MMP-15), 膜型细胞

骨架连结蛋白 Ezrin(埃兹蛋白)、转移抑制基因 nm23-H1、细胞黏附分子 E-cadherin(E-cad)和金属蛋白酶组织抑制因子 -2(tissue inhibitor of metalloproteinase-2, TIMP-2)在鼻咽癌、癌旁鼻咽上皮和慢性炎性鼻咽上皮组织中的蛋白质表达, 并对同一条件下的检测结果与临床病理资料进行等级聚类和相关性分析, 探讨肿瘤转移相关基因的蛋白质表达与鼻咽癌侵袭、转移的关系, 以期筛选鼻咽癌淋巴结转移的相关分子标志物。

* 国家重大科学研究计划(973)(2006CB910502, 2006CB910504), 国家高技术研究发展计划(863)(2007AA02Z170), 高等学校创新引智计划(111-2-12)和湖南省自然科学基金(06JJ2013)资助项目。

** 通讯联系人。

Tel: 0731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

收稿日期: 2008-10-18, 接受日期: 2009-04-03

1 材料与方法

1.1 组织微阵列切片与临床资料

前期实验制作含 390 个点阵的鼻咽癌组织微阵列^[5,6](图 1)。组织微阵列切片中包括鼻咽部的良、恶性病变标本共 312 例,其中鼻咽癌 148 例,癌旁鼻咽上皮 81 例,鼻咽慢性炎性黏膜上皮 83 例。

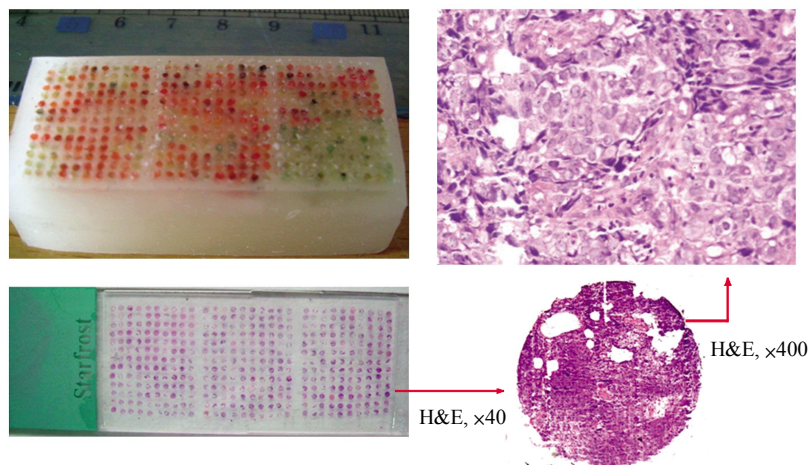


Fig. 1 Receptive paraffin block of NPC tissue array including of 390 tissue spots, H&E section and viewing the NPC under a light microscope at a low (×40) and high magnification (×400)

1.2 主要试剂

兔抗人多克隆抗体 MT1-MMP, MT2-MMP 为 Lab Vision & NEOMARKERS 产品,鼠抗人单克隆抗体 nm23-H1, E-cad, TIMP-2 和 Ezrin 购于 Santa Cruz Biotechnology 公司. S-P 二步法即用型抗鼠或抗兔 (Two-Step™ Anti-Mouse or Rabbit Detection Reagent, HRP) 免疫组化检测试剂盒为 Novocastra laboratories Ltd 产品,正常非免疫兔、羊血清和 AEC 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组化检测鼻咽癌相关基因在组织微阵列中的蛋白质表达

免疫组化 S-P 法参照试剂盒说明书并稍加修改^[6]。组织微阵列切片脱蜡、水化后,置入 3% H_2O_2 中室温 30 min,阻断内源性过氧化物酶。抗原修复:根据检测的抗体说明书所推荐的修复方法,分别使用微波或酶消化抗原修复。组织微阵列切片置于 0.01 mol/L 柠檬酸盐缓冲液中,微波抗原修复 20 min。酶消化抗原修复用 0.1% 胰蛋白酶,37℃ 消化 25 min,正常山羊或兔血清室温封闭 30 min。切片滴加一抗(按抗体说明书 1:50 或 1:100、1:200 不等的比例稀释),置于密封湿盒

148 例鼻咽癌中临床 I 期鼻咽癌 45 例、II 期 50 例、III 和 IV 期共 53 例。经临床检查、CT 检测或淋巴结活检病理诊断证实有颈淋巴结转移的鼻咽癌 100 例,无淋巴结转移者 48 例。按 WHO 鼻咽癌组织学分类^[1],鼻咽分化型非角化性癌 127 例,鼻咽型未分化癌 17 例,分化差的角化性癌 4 例。

中 4℃ 孵育过夜,滴加即用型二抗于室温(25℃ 以上)30 min。AEC 显色,显微镜下控制染色强度,苏木精复染,水性封片剂和相应规格盖玻片封片。利用各抗体的阳性对照片作为阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果评估

参照文献[6]并做适当修改,基于蛋白质表达的阳性强度和阳性细胞数进行综合评分。阳性染色强度:细胞无染色记 0 分;细胞呈浅红色,弱阳性,记 1 分;细胞呈红色,并无背景染色,或细胞呈深红色、有浅红色背景,为中等阳性,记 2 分;细胞呈深红色,无背景着色,为强阳性,记 3 分。阳性细胞数:无阳性细胞表达,计 0 分;阳性表达细胞 ≤ 25%,计 1 分;25% < 阳性细胞数 ≤ 50%,计 2 分;阳性表达细胞数 > 50%,计 3 分。上述两种判断标准得分乘积为最终计分结果:0 分为阴性;1, 2, 3, 4, 6, 9 为阳性。

1.5 检测结果与临床病理资料的等级聚类和相关性分析

参照文献[7]建立免疫组化检测结果的 Window Excel 数据库, TMA-Deconvoluter 软件对检测结果与临床资料数据进行聚类前转换和整合处理,

Cluster 软件进行检测结果和临床资料的等级聚类分析, TreeView 软件制作聚类后的树模型图. SPSS10.0 软件对各基因的蛋白质表达与鼻咽癌临床病理特征进行 χ^2 检验、Spearman's 相关性分析和多因素回归分析.

2 结 果

2.1 转移相关基因在鼻咽癌组织微阵列中的蛋白质表达

蛋白质阳性表达结果为红色染色, MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin、nm23-H1 和 E-cad 蛋白质阳性表达主要位于鼻咽癌细胞细胞浆, 部分为浆膜共同阳性染色(图 2a, 图 2b, 图 2c, 图 2d, 图 2f)、少数慢性炎性鼻咽黏膜和癌旁上皮的细胞浆或细胞浆膜阳性. TIMP-2 蛋白阳性表达位于鼻咽癌、癌旁、慢性炎性鼻咽黏膜上皮组织细胞浆(图 2e), 间质少数淋巴细胞和纤维细胞阳性染色.

MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin, nm23-H1、TIMP-2 和 E-cad 蛋白在鼻咽癌组织、癌旁鼻咽上皮组织和慢性炎性鼻咽上皮中的蛋白质表达结果见表 1. MT1-MMP 和 Ezrin 蛋白在鼻咽癌组织中的阳性表达明显高于鼻咽炎性上皮($P < 0.05$). 癌旁鼻咽上皮与慢性炎性鼻咽上皮组织中 MT1-MMP 和 Ezrin 蛋白的阳性表达比较无统计学差异($P > 0.05$). 鼻咽癌组织中 nm23-H1 和 TIMP-2 蛋白的阳性表达显著低于其在癌旁鼻咽上皮组织和鼻咽炎性黏膜上皮中的表达($P < 0.01$), 但 MT2-MMP 和 E-cad 蛋白在鼻咽癌、癌旁鼻咽上皮和慢性炎性鼻咽上皮组织中的表达无统计学差异($P > 0.05$).

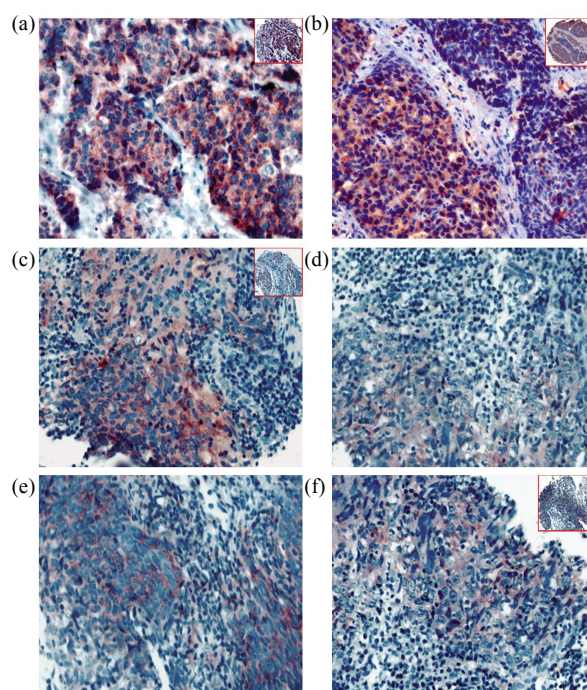


Fig. 2 Expression of MT1-MMP, MT2-MMP, Ezrin, nm23-H1, TIMP-2 and E-cad proteins in the NPC

(a) Positive expression of MT1-MMP in NPC, the strong positive red staining was mainly located in NPC cytoplasm, also there was less NPC cells with plasma-membrane positive staining (IHC, AEC staining, $\times 400$). (b) Positive expression of MT2-MMP in NPC, the strong positive red staining was mainly located in NPC cytoplasm, also less NPC cells with plasma-membrane positive staining (IHC, AEC staining, $\times 200$). (c) Positive expression of Ezrin in NPC, the moderate positive red staining was mainly located in NPC cytoplasm, also less NPC cells with plasma-membrane positive staining (IHC, AEC staining, $\times 400$). (d) Positive expression of nm23-H1 in NPC, the weak positive red staining was mainly located in NPC cytoplasm (IHC, AEC staining, $\times 400$). (e) Positive expression of TIMP-2 in NPC, the moderate positive red staining was located in NPC cytoplasm (IHC, AEC staining, $\times 400$). (f) Positive expression of E-cad in NPC, the weak positive red staining was mainly located in NPC cytoplasm (IHC, AEC staining, $\times 400$).

Table 1 Expression of tumor metastasis-related gene proteins in NPC and non-tumor nasopharyngeal epithelium

Histology (N)	MT1-MMP		MT2-MMP		Ezrin		nm23-H1		TIMP-2		E-cad	
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
NPC(148)	126	22	93	55	91	57	68	80	80	68	96	52
Peri-cancer NPE (81)	63	18	48	33	40	41	59 ²⁾	22	65 ²⁾	16	63	18
Chronic inflammatory NPE (83)	61 ¹⁾	22	45	38	36 ¹⁾	47	64 ²⁾	19	74 ²⁾	9	64	19

NPC: Nasopharyngeal cancer; NPE: Nasopharyngeal epithelium. Chi-square test, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.2 转移相关基因的蛋白质表达与鼻咽癌临床病理特征的关系

MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin、nm23-H1、TIMP-2 和 E-cad 蛋白表达与鼻咽癌临床分期和淋巴结转移的相关性分析结果见表 2. 临床 I 期鼻咽癌 MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白阳性表达

明显低于临床 II 期、临床 III 和 IV 期鼻咽癌($P < 0.05$, $P < 0.01$). 临床 I 期鼻咽癌组织中 nm23-H1 的阳性表达显著高于临床 II 期、临床 III 和 IV 期鼻咽癌($P < 0.05$). 淋巴结转移鼻咽癌中 nm23-H1 蛋白表达显著低于无转移鼻咽癌($P < 0.01$), 但 MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白在转移性鼻

咽癌中的表达显著高于无转移鼻咽癌($P < 0.05$, $P < 0.01$). E-cad 和 TIMP-2 蛋白表达与鼻咽癌临床分期和淋巴结转移无统计学差异($P > 0.05$). MT1-

MMP、MT2-MMP、Ezrin、nm23-H1、TIMP-2 和 E-cad 蛋白表达与鼻咽癌的组织学类型均无统计学意义($P > 0.05$).

Table 2 Association between protein expression of tumor metastasis-related genes and clinicopathological characteristics of NPC

Clinicopathological features	N	nm23-H1		E-cad		Ezrin		TIMP-2		MT1-MMP		MT2-MMP	
		+	−	+	−	+	−	+	−	+	−	+	−
Histological features													
NKC	127	59	68	81	46	78	49	70	57	109	18	79	48
UC	17	6	11	13	4	10	7	7	10	15	2	12	5
KSCC	4	3	1	2	2	3	1	3	1	2	2	2	2
TNM classification													
Stage I	45	27 ¹⁾	18	33	12	19 ²⁾	26	25	20	33 ¹⁾	12	20 ¹⁾	25
Stage II	50	22	28	34	16	31	19	27	23	48	2	36	14
Stage III and IV	53	19	34	29	24	41	12	28	25	45	8	37	16
LN metastasis status													
LN metastasis	100	39 ¹⁾	61	60	40	69 ²⁾	31	52	48	90 ¹⁾	10	70 ²⁾	30
No LN metastasis	48	29	19	36	12	22	26	28	20	36	12	23	25

NKC: Nonkeratinizing carcinomas; UC: Undifferentiated carcinomas; KSCC: Keratinizing squamous cell carcinomas, LN: Lymph node. Chi-square test, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.3 鼻咽癌组织中转移相关基因蛋白质表达的相关性分析

MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin、nm23-H1、TIMP-2 和 E-cad 在 148 例鼻咽癌组织中蛋白质表达的相关性分析结果见表 3. 鼻咽癌组织中 MT1-MMP 与 MT2-MMP($r = 0.308$, $P < 0.001$)的表达呈显著正相关, 但 MT1-MMP 分别与 E-cad($r = -0.188$, $P < 0.05$)及 TIMP-2($r = -0.233$, $P < 0.05$)的蛋白质表达呈显著负相关. 鼻咽癌组织中 Ezrin 与 E-cad 的

蛋白质表达呈显著负相关($r = -0.204$, $P < 0.05$). nm23-H1 也分别与 E-cad ($r = 0.167$, $P < 0.05$)和 TIMP-2($r = 0.279$, $P = 0.001$)的蛋白质表达呈显著正相关. 此外, 鼻咽癌组织中 E-cad 与 TIMP-2 蛋白表达呈显著正相关($r = 0.279$, $P = 0.001$). MT1-MMP 与 Ezrin; nm23-H1, MT2-MMP 与 Ezrin、nm23-H1、及 TIMP-2, Ezrin 与 nm23-H1 及 TIMP-2 的蛋白质表达均无统计学相关性差异($P > 0.05$).

Table 3 Pairwise associations between expression of MT1-MMP, MT2-MMP, Ezrin, nm23-H1, TIMP-2 and E-cad in NPC

	N	MT2-MMP		Ezrin		Nm23-H1		E-cad		TIMP-2	
		+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
MT1-MMP											
+	126	87	39 ²⁾	81	45	59	67	77	49 ¹⁾	62	64 ¹⁾
-	22	6	16	10	12	9	13	19	3	18	4
MT2-MMP											
+	93	-	-	59	34	42	51	56	37	46	47
-	55	-	-	32	23	26	29	40	15	34	21
Ezrin											
+	91	-	-	-	-	38	53	52	39 ¹⁾	47	44
-	57	-	-	-	-	30	27	44	13	33	24
Nm23-H1											
+	68	-	-	-	-	-	-	50	18 ²⁾	47	21 ²⁾
-	80	-	-	-	-	-	-	46	34	33	47
E-cad											
+	96	-	-	-	-	-	-	-	-	58	38 ¹⁾
-	52	-	-	-	-	-	-	-	-	22	30

Spearman's correlation test, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ (2-tailed).

2.4 等级聚类分析鼻咽癌转移相关基因的蛋白质表达与鼻咽癌淋巴结转移的关系

利用 TMA-Deconvoluter、Cluster 和 TreeView 软件^[7]对转移相关基因的蛋白质表达结果与鼻咽癌的临床病理特征进行等级聚类分析, 图 3 显示聚类

后的树模型图。这些肿瘤转移相关基因的蛋白质表达结果在鼻咽癌组织中的聚类为两大类: MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 为一类; E-cad、nm23-H1 和 TIMP-2 为一类。

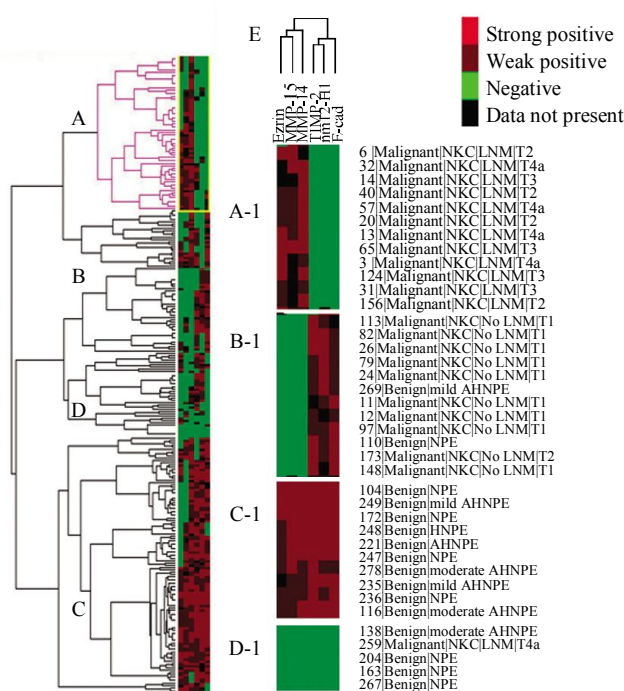


Fig. 3 Unsupervised hierarchical clustering results of MT1-MMP(MMP-14), MT2-MMP(MMP-15), Ezrin, nm23-H1, TIMP-2 and E-cad proteins expression in NPC tissue arrays

Rows of dendrogram represent cases, and columns represent different genes. The dendrogram on the left (A, B, C and D) indicated the relatedness of the expression profiles of individual cases, whereas the dendrogram on the top (E) indicated the relatedness of proteins expression patterns of the genes listed. The cases with common positive or negative molecular phenotypes were shown of high magnification in the right panel (A-1, B-1, C-1 and D-1).

聚类后的 MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin、E-cad、nm23-H1 和 TIMP-2 蛋白在鼻咽癌、癌旁鼻咽上皮和慢性炎性鼻咽上皮中共同阳性表达或共同表达缺失的相关性分析结果见表 4。鼻咽癌 MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin 蛋白共同阳性表达

显著高于慢性炎性鼻咽上皮($P < 0.05$)。nm23-H1、E-cad、TIMP-2 蛋白在鼻咽癌组织中的共同阴性表达明显高于癌旁上皮和慢性炎性鼻咽上皮($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

Table 4 Analysis of the common expression or common loss expression of MT1-MMP, MT2-MMP, Ezrin, nm23-H1, TIMP-2 and E-cad proteins in NPC

Histological features	MT1-MMP, MT2-MMP and Ezrin		nm23-H1, E-cad and TIMP-2	
	Common positive	Common negative	Common positive	Common negative
NPC	56 ¹⁾	10	35	20
Peri-cancer NPE	28	9	45	6 ¹⁾
Chronic inflammatory NPE	13	9	51	4 ²⁾

NPC: Nasopharyngeal cancer; NPE: Nasopharyngeal epithelium, Chi-square test, ¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$.

2.5 评估肿瘤转移相关基因蛋白质表达在预测鼻咽癌淋巴结转移的有效性

进一步对转移相关基因在鼻咽癌中的蛋白质表达结果、鼻咽癌的临床分期与鼻咽癌淋巴结转移的

相关性进行二分类 Logistic 回归分析(binary logistic regression). 表 5 结果显示, MT1-MMP 和 nm23-H1 蛋白表达用于判断淋巴结转移具有独立预后价值 ($P<0.05$, $P<0.01$).

Table 5 Logistic regression analyze the association between the MT1-MMP, MT2-MMP, Ezrin, nm23-H1, TIMP-2 and E-cad proteins expression and lymph node metastasis of NPC

Values	B	S.E.	Wald	Sig.	Exp(B)	95.0% C.I. for EXP(B)	
						Lower	Upper
MT1-MMP	1.207	0.178	46.060	0.000	3.345	2.360	4.740
MT2-MMP	-0.156	0.106	2.170	0.141	0.856	0.695	1.053
Ezrin	0.054	0.182	0.088	0.767	1.056	0.738	1.509
E-cad	-0.124	0.156	0.629	0.428	0.883	0.651	1.200
nm23-H1	-0.389	0.183	4.514	0.034	0.678	0.474	0.970
TIMP2	-0.208	0.178	1.369	0.242	0.812	0.573	4.740

同时利用灵敏度、特异度和阳性预测值、阴性预测值和符合率等指标综合评估肿瘤转移相关基因的蛋白质表达用于预测鼻咽癌淋巴结转移的有效性, 结果见表 6. 这些肿瘤转移相关基因的蛋白质

表达用于预测鼻咽癌淋巴结转移的灵敏度均大于 70%, 而特异度、阳性预测值和符合率以 MT1-MMP 最佳.

Table 6 Validity estimation of MT1-MMP, MT2-MMP, Ezrin, nm23-H1, TIMP-2 and E-cad proteins expression in predicting the lymph node metastasis of NPC

	Sensitivity/%	Specificity/%	Positive predictive value/%	Negative predictive value/%	Agreement rate/%
nm23-H1	76.3	42.6	61.0	60.4	60.0
E-cad	76.9	37.5	40.0	75.0	51.4
Ezrin	75.8	45.6	69.0	54.2	64.2
TIMP-2	70.6	35.0	48.0	58.3	51.4
MT1-MMP	71.4	54.5	90.0	25.0	68.9
MT2-MMP	75.3	45.5	70.0	52.1	64.2

3 讨 论

鼻咽癌侵袭、转移过程中涉及多个基因的表达异常, 存在转移相关基因如胶原蛋白酶Ⅳ、基质金属蛋白酶 MMP-2、MMP-1 等过度表达和 TIMP-1、TIMP-2、nm23-H1、E-cad 蛋白低表达^[1~4, 8, 9], 但这些研究大多只考虑某个(些)基因对鼻咽癌的作用, 缺乏大规模、高通量地利用大样本量鼻咽癌组织同时研究鼻咽癌相关基因的表达与鼻咽癌发生、发展关系. 组织微阵列能高通量地同时检测多个基因在鼻咽癌组织中的原位表达, 并可对基因表达结果和临床资料数据进行等级聚类和相关性分析, 这样能将鼻咽癌发生、发展过程中的形态学改变与鼻咽癌发生、发展各阶段中所发生的分子事件联系起来进

行综合研究^[6, 7]. 这种大规模的研究方法不但能为鼻咽癌早期诊断、治疗和预后预测分子标志的筛选提供一种新高通量技术平台, 而且能全面系统地阐明各基因在鼻咽癌发生、发展过程中相互作用的生物学功能. 本研究利用前期实验已制作的鼻咽癌组织微阵列^[5, 6], 免疫组化法检测 MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin、nm23-H1、E-cad 和 TIMP-2 在鼻咽癌组织微阵列中的蛋白质表达. 利用聚类分析和相关性分析软件对检测结果进行综合分析^[7], 试图比较全面系统地阐明这些肿瘤转移相关基因在鼻咽癌发生、发展过程中相互作用的生物学功能, 筛选可用于鼻咽癌侵袭转移的分子标志物.

膜型基质金属蛋白酶(membrane-type matrix metalloproteinase, MT-MMP)是一类基质金属蛋白

酶家族的新成员, MT1-MMP 是第一个被证实的膜型基质金属蛋白酶, 它直接或间接降解细胞外基质中的多种成分, 并对黏附分子有调节作用, 被认为是 MMP 家族中与肿瘤侵袭关系最密切的酶, 具有独特的结构、功能与调节机制^[10]. MT1-MMP 的表达能激活 MMP-2 蛋白酶原成为具有活性的基质金属蛋白酶-2, 使 MMP-2 与 MMP-9 形成二聚体, 发挥其溶解Ⅳ胶原的功能^[10]. Ezrin 蛋白作为膜型细胞骨架连接蛋白, 在多种肿瘤中表达增加并与肿瘤患者短的生存时间相关^[11, 12]. 目前暂未见研究鼻咽癌组织中膜型基质金属蛋白酶 MT1-MMP 和 MT2-MMP 表达的文献报道. 本研究结果显示, MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白表达与鼻咽癌临床进展和鼻咽癌发生淋巴结转移呈正相关, 这一结果提示, MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白在鼻咽癌侵袭、转移过程中发挥重要作用.

本研究结果发现, 鼻咽癌组织中存在 MT1-MMP、Ezrin 蛋白过表达和 nm23-H1、TIMP-2 蛋白表达下降. 临床 I 期鼻咽癌组织中 MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 蛋白的阳性表达明显低于临床 II 期、III 期和 IV 期鼻咽癌, 临床 I 期鼻咽癌组织中 nm23-H1 蛋白的阳性表达显著高于临床 II 期、III 期和 IV 期鼻咽癌. 转移性鼻咽癌组织中 MT1-MMP、MMP15 和 Ezrin 蛋白的阳性表达显著高于无转移鼻咽癌, 但淋巴结转移鼻咽癌中 nm23-H1 蛋白表达显著低于无转移鼻咽癌. 鼻咽癌组织中 MT1-MMP 与 MT2-MMP, nm23-H1 与 E-cad, nm23-H1 与 TIMP-2, E-cad 与 TIMP-2 的蛋白质表达均呈显著正相关; MT1-MMP 与 E-cad, MT1-MMP 与 TIMP-2, Ezrin 与 E-cad 的蛋白质表达均呈显著负相关. MT1-MMP、MT2-MMP 和 Ezrin 基因在鼻咽癌中的共同阳性率显著高于癌旁上皮和鼻咽炎性上皮, 但 nm23-H1、E-cad、TIMP-2 基因在鼻咽癌中的共同阳性率明显低于癌旁上皮和鼻咽炎性上皮. 这些结果提示, 鼻咽癌在其发生、发展的不同病变阶段中, 先后存在不同基因群的变化. 鼻咽癌易于发生颈部淋巴结转移, 可能与多个肿瘤转移相关基因的激活和转移抑制基因的失活以及这些基因的蛋白质表达失衡有关. 本实验通过多因素回归分析和利用灵敏度等指标进一步评估 MT1-MMP、MT2-MMP、Ezrin, nm23-H1、TIMP-2 和 E-cad 是否可作为预测鼻咽癌淋巴结转移的分子标志物^[13], 结果显示, MT1-MMP 和 nm23-H1 可作为鼻咽癌淋巴结转移的预测指标,

其中 MT1-MMP 蛋白阳性表达的特异度、阳性预测值和符合率等指标均为较好.

本研究结果提示, 多个肿瘤转移基因的蛋白质高表达, 转移抑制基因的低表达和这些基因表达的失衡在鼻咽癌淋巴结转移和临床进展过程中起重要作用, MT1-MMP 蛋白可作为临床预测鼻咽癌淋巴结转移较好的分子标志.

参 考 文 献

- Spano J P, Busson P, Atlan D, *et al.* Nasopharyngeal carcinomas: an update. *Eur J Cancer*, 2003, **39**(15): 2121~2135
- Farias T P, Dias F L, Lima R A, *et al.* Prognostic factors and outcome for nasopharyngeal carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 2003, **129** (7): 794~799
- Tsao S W, Liu Y, Wang X, *et al.* The association of E-cadherin expression and the methylation status of the E-cadherin gene in nasopharyngeal carcinoma cells. *Eur J Cancer*, 2003, **39**(4): 524~531
- Huang G W, Mo W N, Kuang G Q, *et al.* Expression of p16, nm23-H1, E-cadherin, and CD44 gene products and their significance in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*, 2001, **111** (8): 1465~1471
- 范松青, 张文玲, 李桂源, 等. 一种组织微阵列供体取样与受体蜡块制作的新器具和新方法. *生物化学与生物物理进展*, 2005, **32** (5): 474~479
- Fan S Q, Zhang W L, Li G Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2005, **32**(5): 474~479
- Fan S Q, Ma J, Li G Y, *et al.* Differential expression of Epstein-Barr virus-encoded RNA and several tumor-related genes in various types of nasopharyngeal epithelial lesions and nasopharyngeal carcinoma using tissue microarray analysis. *Hum Pathol*, 2006, **37**(5): 593~605
- Liu C L, Prapong W, Natkunam Y, *et al.* Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. *Am J Pathol*, 2002, **161**(5): 1557~1565
- Hofmann U B, Eggert A A, Blass K, *et al.* Expression of matrix metalloproteinases in the microenvironment of spontaneous and experimental melanoma metastases reflects the requirements for tumor formation. *Cancer Res*, 2003, **63**(23): 8221~8225
- Daja M M, Niu X, Zhao Z, *et al.* Characterization of expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in prostate cancer cell lines. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 2003, **6** (1): 15~26
- Seiki M. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase: a key enzyme for tumor invasion. *Cancer Lett*, 2003, **194**(1): 1~11
- Curto M, McClatchey A I. Ezrin—a metastatic determinant? *Cancer Cell*, 2004, **5**(2): 113~114
- Deng X, Tannehill-Gregg S H, Nadella M V, *et al.* Parathyroid hormone-related protein and ezrin are up-regulated in human lung cancer bone metastases. *Clin Exp Metastasis*, 2007, **24**(2): 107~119
- 李立明. 流行病学. 第四版. 北京: 人民卫生出版社, 1999. 150~157
- Li L M. *Epidemiology*. 4th. Beijing: People's Medical Press, 1999. 150~157

Investigation of Clinical Significance and Expression of Tumor Metastasis-related Genes in The Nasopharyngeal Cancer Using Tissue Microarray Technique*

FAN Song-Qing^{1,2}, ZHANG Wen-Ling¹, XU Li-Na², ZHOU Yan-Hong¹, LI Gui-Yuan¹**

¹Cancer Research Institute of Central South University, Changsha 410078, China;

²Department of Pathology, The Second Xiangya Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

Abstract To investigate the role of abnormal protein expression of the tumor metastasis related-genes in invasion and metastasis of nasopharyngeal cancer (NPC) and to seek the metastasis-related markers for NPC, high-throughput tissue microarray and immunohistochemistry were used to detect protein expression of membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP), membrane type 2-matrix metalloproteinase (MT2-MMP), membrane-cytoskeletal crosslinker Ezrin (Ezrin), metastasis suppressor gene nm23-H1, the epithelial cell adhesion molecule E-cadherin (E-cad) and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in NPC. Results showed that significant high expression of MT1-MMP and Ezrin proteins and very low expression of nm23-H1 and TIMP-2 proteins were found in NPC compared with non-cancerous nasopharyngeal epithelium ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Expression of MT1-MMP, MT2-MMP and Ezrin proteins in the stage II, stage III and IV NPC and NPC with lymph node metastasis is significantly higher than that of in the stage I NPC and NPC without lymph node metastasis ($P < 0.05$, $P < 0.01$ respectively), but expression of nm23-H1 protein in the stage II, stage III and IV NPC and NPC with lymph node metastasis is significantly lower than that of in the stage I NPC and NPC without lymph node metastasis ($P < 0.05$). There were significantly positive correlation between MT1-MMP and MT2-MMP ($r = 0.308$, $P < 0.001$), nm23-H1 and E-cad ($r = 0.167$, $P < 0.05$), nm23-H1 and TIMP-2 ($r = 0.279$, $P = 0.001$); E-cad and TIMP-2 ($r = 0.279$, $P = 0.001$) in the NPC. Also, there were obviously negative correlation between MT1-MMP and E-cad ($r = -0.188$, $P < 0.05$), MT1-MMP and TIMP-2 ($r = -0.233$, $P < 0.05$), Ezrin and E-cad ($r = -0.204$, $P < 0.05$) in NPC. Based on the cluster analysis, there was common higher expression of MT1-MMP, MT2-MMP and Ezrin proteins in the NPC than that of in the chronic inflammatory nasopharyngeal epithelium ($P < 0.05$). However, common higher loss expression of nm23-H1, E-cad and TIMP-2 proteins were found in NPC compared with the peri-cancer nasopharyngeal epithelium and chronic inflammatory nasopharyngeal epithelium ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Logistic regression analysis and validity estimation indicated that MT1-MMP gene might be better independent prognostic value for metastasis and clinical progress of NPC. The results suggested that high protein expression of multiple metastasis related-genes, low expression of the metastasis suppressor genes and loss balance between metastasis genes and metastasis suppressor genes might play important role in the metastasis and clinical progression of NPC. MT1-MMP protein can be used as the better independent prognostic molecular marker for metastasis of NPC.

Key words tumor metastasis-related genes, nasopharyngeal carcinoma, tissue microarrays, immunohistochemistry

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00440

*The work was supported by grants from The National Key Project of Scientific Research Program(2006CB910502, 2006CB910504), The National 863 Program (2007AA02Z170), The 111 project (111-2-12) and Hunan Provincial Natural Science Foundation of China (06JJ2013).

**Corresponding author.

Tel: 86-731-4805383, E-mail: ligy@xysm.net

Received: October 18, 2008 Accepted: April 3, 2009