

## 内皮素 -1 与基质金属蛋白酶 -2 在喉癌中的表达与浸润转移的相关性研究

林 雁<sup>1)</sup>, 尹 芳<sup>2)</sup>, 袁 莹<sup>2)</sup>, 刘世喜<sup>3)</sup>, 郑明秀<sup>1)</sup>, 张京晶<sup>4)</sup>

(1) 昆明医科大学第二附属医院耳鼻咽喉科, 云南昆明 650101; 2) 昆明医科大学第二附属医院, 云南昆明 650101; 3) 四川大学华西医院耳鼻咽喉头颈外科, 四川成都 610041; 4) 昆明医科大学公共卫生学院, 云南昆明 650500)

**[摘要]** **目的** 探讨内皮素 -1 (ET-1)、基质金属蛋白酶 -2 (MMP-2) 在喉癌中的表达及其与喉癌相关特征的关系. **方法** 应用免疫组化 SP 法对 52 例经手术及病理证实的喉癌标本的 ET-1、MMP-2 表达进行检测, 分析 ET-1、MMP-2 的表达, 同时 28 例声带息肉及 19 例喉部正常粘膜组织作为对照. **结果** ET-1 在喉癌中的阳性表达率为 71.15%, 分别高于对照组中的声带息肉的 50.00% 和正常粘膜组织中的 42.11% ( $P < 0.05$ ); MMP-2 在喉癌中的阳性表达率为 69.23%, 分别高于对照组中的声带息肉的 46.43% 和正常粘膜组织中的 36.84% ( $P < 0.05$ ). 喉癌的 ET-1、MMP-2 表达呈正相关 ( $P < 0.05$ ). **结论** ET-1、MMP-2 的高表达与喉癌的临床病理特征密切相关, 可以作为判断喉癌生长的有效指标; 在肿瘤侵袭生长过程中, ET-1、MMP-2 可能存在协同作用, 共同促进喉癌的发生、发展.

**[关键词]** 内皮素 -1; 基质金属蛋白酶 -2; 喉癌

**[中图分类号]** R739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X (2013) 06 - 0063 - 04

## Expression of ET-1 and MMP-2 in Laryngeal Carcinoma and Their Meanings

LIN Yan<sup>1)</sup>, YIN Fang<sup>2)</sup>, YUAN Ying<sup>2)</sup>, LIU Shi-xi<sup>3)</sup>, ZHENG Ming-xiu<sup>1)</sup>, ZHANG Jing-jing<sup>4)</sup>

(1) Dept. of Otorhinolaryngology, The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 2) The Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming Yunnan 650101; 3) Dept. of Otorhinolaryngology, Head & Neck Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu Sichuan 610041; 4) School of Public Health, Kunming Medical University, Kunming Yunan 650500, China)

**[Abstract]** **Objective** To investigate the expressions of endothelin-1 (ET-1) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in laryngeal carcinoma, and study the correlation of expression and laryngeal carcinoma relevant characteristics. **Methods** The expressions of ET-1 and MMP-2 in 52 samples of laryngeal carcinoma were detected and analyzed by using the immunohistochemical SP method. And 28 samples of vocal polyp and 19 samples of normal laryngeal mucosa tissue were selected as control. **Results** The intense expression (71.15%) of ET-1 of laryngeal carcinoma patients was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). And the intense expression (69.23%) of MMP-2 in laryngeal carcinoma patients was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). There was a positive correlation between the ET-1 and MMP-2 expressions of laryngeal carcinoma. **Conclusion** The high expressions of ET-1 and MMP-2 were related to the invasion and aggressiveness in laryngeal carcinoma and could be used as effective markers for diagnosis. ET-1 and

**[基金项目]** 云南省教育厅科学研究基金资助项目 (2011C077)

**[作者简介]** 林雁 (1976~), 男, 云南昆明市人, 医学博士, 讲师, 主要从事中耳鼻咽喉的临床及科研工作.

**[通讯作者]** 张京晶. E-mail: tree1219@163.com.

MMP-2 may be synergies for promoting the formation and development of laryngeal carcinoma.

[Key words] Endothelin-1; Matrix metalloproteinase-2; Laryngeal carcinoma

喉癌是耳鼻咽喉头颈外科常见的恶性肿瘤,近年来发病有明显上升趋势.而新生血管的形成与细胞外基质的降解在喉癌的浸润和转移这一过程中是两个相当重要的环节.在有关肿瘤生物靶向治疗的研究中,发现内皮素及其受体(ET/ETR)可能是一个潜在目标靶点,与肿瘤的病理及临床进展过程有关<sup>[1]</sup>.有关基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinases, MMPs)的诸多研究也表明MMPs与肿瘤侵袭性相关.其中在关于MMP-2的文献研究中,提示其在肿瘤病理过程中所起到的作用有显著性<sup>[2]</sup>.ET-1、MMP-2之间的相互关系以及二者在喉癌的发生发展过程中所起到的作用尚不明确,迄今未见国内外相关文献报道,本研究基于此研究目的,拟探讨ET-1、MMP-2在喉癌的演进过程中所扮演的角色及与喉癌的病理及生物学特性之间的关系.

## 1 材料与方法

### 1.1 标本来源

昆明医科大学第二附属医院2002年1月至2008年1月收治的喉癌患者的组织52例,其中男45例,女7例;年龄32~78岁,平均53岁,所采用喉癌标本均通过临床及病理确诊,喉癌的临床分期和病理分级采用根据最新版WHO肿瘤分类标准进行分级:I期10例,II期14例,III期13例,IV期15例.其中病灶位于声门上8例,声门35例,声门下9例;高分化癌9例,中分化癌22例,低分化癌21例.T分期1~2期13例,3~4期39例.N分期N022例,N130例.对照组为声带息肉28例,喉部正常粘膜组织19例.

### 1.2 实验标本制备

石蜡包埋,切片后脱蜡,进行抗原修复,ET-1的工作稀释度为1:200,MMP-2的工作稀释度为1:300,电炉或者水浴锅加热0.01 mol/L,按照免疫组化试剂盒进行实验.以磷酸盐缓冲液代替一抗为阴性对照,直肠癌为阳性对照,由2位资深病

理专家对实验标本盲法认定.

### 1.3 ET-1 和 MMP-2 的表达

在染色过程中ET-1和MMP-2的表达的标准是:样本细胞胞质内出现棕黄色颗粒为阳性.随机选择10个SP×400视野,采用阳性细胞百分比及免疫组化染色深度联合进行结果判定.阳性细胞的百分率:<10%为0分,11%~25%为1分,26%~50%为2分,51%~75%为3分,>75%为4分.染色深度:无染色或基本不染色为0分;淡黄色为1分;棕黄色为2分;棕褐色为3分.以阳性细胞百分比及免疫组化染色深度所得分数相加作为总得分.0分为阴性(-),1~3分为弱阳性(+),4~8分为强阳性(++).

### 1.4 统计学处理

所有资料采用SPSS软件进行统计学分析,应用t检验, $\chi^2$ 检验及Spearman等级相关分析,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义.

## 2 结果

### 2.1 ET-1、MMP-2 在喉癌中的表达

喉癌与对照组中的声带息肉及喉部正常粘膜中ET-1阳性率分别为71.15%、50.00%和42.11%,喉癌中ET-1表达阳性率均明显高于对照组( $P<0.05$ ),MMP-2的阳性率分别为69.23%、46.43%和36.84%,在声带息肉及喉部正常粘膜中MMP-2的表达,大部分呈弱阳性,见表1及图1~2.

### 2.2 喉癌中 ET-1、MMP-2 表达与病理及临床特征之间的关系

结果显示喉癌中ET-1、MMP-2表达与各临床指标之间的相关关系,可看出ET-1与MMP-2的表达在临床组别、浸润深度、淋巴结转移、分化程度的差异有统计学意义( $P<0.05$ ),而在喉癌患者在其余指标中的差异无统计学意义( $P>0.05$ ).经Spearman相关检验发现,喉癌ET-1与MMP-2的表达有显著相关( $P<0.05$ ),见表2.

表 1 ET-1、MMP-2 在喉癌组织中的表达

Tab. 1 The expression of ET-1 and MMP-2 in the tissues of laryngeal carcinoma

组别	n	ET-1		MMP-2	
		阳性	阳性率 (%)	阳性	阳性率 (%)
喉癌	52	37	71.15	36	69.23
声带息肉	28	14	50.00	13	46.43
正常粘膜	19	8	42.11	7	36.84

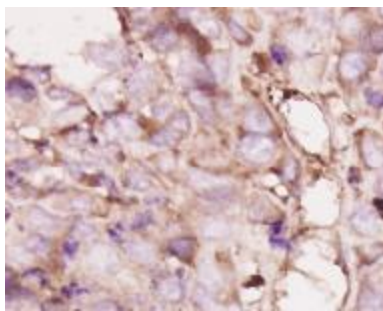


图1 ET-1在喉癌中的表达 (SP×400)

Fig. 1 The expression of ET-1 in laryngeal carcinoma

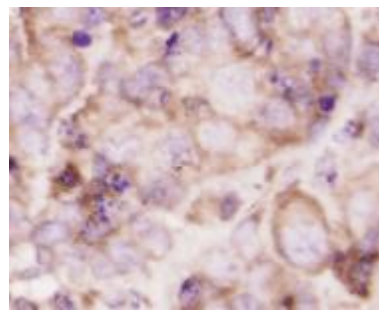


图2 MMP-2在喉癌中的表达 (SP×400)

Fig. 2 The expression of MMP-2 in laryngeal carcinoma

表2 喉癌中 ET-1、MMP-2 表达与临床指标的关系

Tab. 2 The relationships of ET-1 and MMP-2 expression and clinical indicators

临床病理特征	n	ET-1		MMP-2	
		阳性	阳性率 (%)	阳性	阳性率 (%)
性别					
男	45	34	75.56	31	68.89
女	7	3	42.86	5	71.43
年龄 (岁)					
≥60	10	7	70.00	5	50.00
<60	42	30	71.43	31	73.81
病灶部位					
声门上	8	4	60.00	6	75.00
声门	35	27	77.14	26	72.73
声门下	9	6	66.67	4	54.55
分化程度					
低分化	21	18	85.71	17	80.95
中分化	22	17	77.27	17	77.27
高分化	9	2	22.22	3	33.33
T分期					
T1 + T2	13	5	38.46	5	38.46
T3 + T4	39	32	82.05	31	79.49
N分期					
N0	22	10	45.45	11	50.00
N1	30	27	90.00	25	83.33
临床分期					
I + II	24	13	54.17	11	45.83
III + IV	28	24	85.71	25	89.29

### 3 讨论

多步骤、复杂性及连续性是恶性肿瘤的侵袭和转移过程的主要特点,近年来不断有关于内皮素与肿瘤相互关系的文献报道,有关内皮素的研究也逐渐成为肿瘤靶向治疗的热点之一。

内皮素 (endothelin, ET) 属于生物活性肽,由内皮细胞分泌而成的,其中文献报道及研究最多

的是内皮素 1 (ET-1)<sup>[3]</sup>。有研究显示, ET-1/ETR 参与肿瘤细胞的分化增殖,促进肿瘤的发生、发展,并与多种肿瘤生长因子具有密切的相关性<sup>[4]</sup>。有研究显示 ET-1 的存在有显著性差异,与肿瘤的血供和分化程度有一定相关性<sup>[5-7]</sup>。

还有在细胞外基质 (extra cellular matrix, ECM) 和基膜 (basement membranes, BM) 的研究文献中提示二者与肿瘤的侵袭转移在一定程度上

具有相关性<sup>[8]</sup>。

基质金属蛋白酶 (MMPs) 与肿瘤演进过程中的侵袭转移能力也有一定相关性<sup>[9,10]</sup>。也有文献指出 ET-1 与 MMP-2 进行协同作用, 从而影响肿瘤的侵袭性<sup>[11,12]</sup>。实验中笔者采用免疫组化 SP 法来检测 ET-1 和 MMP-2 的表达, 目的是进一步揭示及阐述 ET-1、MMP-2 之间及与喉部恶性肿瘤之间的可能关系, 并为头颈部恶性肿瘤的治疗提供进一步的实验数据, 目前未见相关报道。

实验数据显示: ET-1 和 MMP-2 在喉癌组织中阳性表达率分别为 71.15% 和 69.23%, 表明 ET-1 和 MMP-2 的表达可能与喉癌的良恶程度有关。有关肿瘤的文献认为, 经常出现的组织细胞坏死, 可能使 ET-1 的表达增高趋势明显。在肿瘤侵袭转移过程中, MMP-2 可以降解 ECM 中的纤维蛋白及胶原。在侵袭性较强的喉癌样本中 MMP-2 同样呈高度表达。笔者的实验结果发现喉癌 ET-1 与 MMP-2 的表达呈正相关 ( $P < 0.05$ ), 同时实验中显示 ET-1、MMP-2 的表达与喉癌的病理及临床特征也有一定的关系 ( $P < 0.05$ )。上述结果表明 ET-1 与 MMP-2 的高表达可能与喉癌发生、发展及演进有一定相关性, 这与笔者之前的实验研究结论一致<sup>[13,14]</sup>。

综上所述, 本文通过对 ET-1、MMP-2 在喉癌组织中的分析表明, ET-1、MMP-2 在喉癌的发生、发展存在一定的作用。但分子生物学方面的具体机制还待进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] KNOWLES J P, SHI-WEN X, HAQUE SU, et al. Endothelin-1 stimulates colon cancer adjacent fibroblasts [J]. *Int J Cancer*, 2012, 130 (6):1 264 - 1 272.
- [2] HEGARTY P K. Editorial: MMP-2 and MMP-9 in lymphnode positive bladder cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2012, 65 (5):470 - 471.
- [3] HINSLEY E E, KUMAR S, HUNTER K D, et al. Endothelin-1 stimulates oral fibroblasts to promote oral cancer invasion [J]. *Life Sci*, 2012, 91(13-14):557 - 561.
- [4] MONTIRONI R, MAZZUCHELLI R, BARBISAN F, et al. Immunohisto-chemical expression of endothelin-1 and endothelin-A and endothelin-B receptors in high-grade prostatic intra-epithelial neoplasia and prostate cancer [J]. *Eur Urol*, 2007, 52(6):1 682 - 1 689.
- [5] LALICH M, MCNEEL D G, WILDING G, et al. Endothelin receptor antagonists in cancer therapy [J]. *Cancer Invest*, 2007, 25 (8):785 - 794.
- [6] BAGNATO A, ROSANO L. The endothelin axis in cancer [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(8):1 443 - 1 451.
- [7] BHALLA A, HAQUE S, TAYLOR I, et al. Endothelin receptor antagonism and cancer [J]. *Eur J Clin Invest*, 2009, 39 (2):74 - 77.
- [8] OLEJNICZAK I, FENDLER W, BOROWIEC M, et al. Polymorphism of metalloproteinases MMP-1 and MMP-2 in risk of laryngeal cancer [J]. *Otolaryngol Pol*, 2012, 66(4 Suppl):30 - 35.
- [9] GONZALEZ-ARRIAGA P, PASCUAL T, GARCIA-ALVAREZ A, et al. Genetic polymorphisms in MMP 2, 9 and 3 genes modify lung cancer risk and survival [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12(2):121.
- [10] PARTYKA R, GONCIARZ M, JALOWIECKI P, et al. VEGF and metalloproteinase 2 (MMP-2) expression in gastric cancer tissue [J]. *Med Sci Monit*, 2012, 18 (4): 130 - 134.
- [11] REEL B, OKTAY G, OZKAL S, et al. MMP-2 and MMP-9 alteration in response to collaring in rabbits: the effects of endothelin receptor antagonism [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2009, 14 (4):292 - 301.
- [12] MA L J, LI Y G, HUANG L, et al. Expression of LOX and MMP-2 in gastric cancer tissue and the effects of LOX and MMP-2 on tumor invasion and metastasis [J]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi*, 2011, 33(1):37 - 41.
- [13] 林雁, 张京晶, 刘世喜, 等. 内皮素 A 受体拮抗剂在喉癌种植瘤的实验研究 [J]. *华西医学*, 2009, 24(10):2 674 - 2 676.
- [14] 林雁, 张京晶, 刘世喜, 等. 内皮素 - 1 与基质金属蛋白酶 - 9 在喉癌中的表达与临床病理特征的相关性研究 [J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2012, 26(6): 245 - 251.

(2013 - 02 - 10 收稿)