

应用组织微阵列技术研究 MMP-9 与 TIMP-1 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及临床意义

王喜梅¹, 孙 雷^{2*}, 郑仁恕², 张 众²

Expression and Clinical Significance of MMP-9 and TIMP-1 in Epithelial Ovarian Tumor Using Tissue Microarray Technique

WANG Xi-mei¹, SUN Lei^{2*}, ZHEN Ren-su², ZHANG Zong²

1. Department of Basical Medicine, Huaihua Medical College, Huaihua 418000, China; 2. China Japan Clinical Pathology Center, Medical College of Dalian (* Corresponding Author)

Abstract : **Objective** To study the expression of Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) and Tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in epithelial ovarian tumor and their clinical significance. **Methods** The expressions of MMP-9 and TIMP-1 in 94 cases of epithelial ovarian tumor were determined by tissue microarray combined with immunohistochemistry. **Results** The positive rates of MMP-9 in borderline and ovarian adenocarcinoma tissue were significantly higher than that in benign tumor tissue ($P < 0.01$). The positive rate of TIMP-1 in ovarian adenocarcinoma tissue was also significantly higher than that in benign tumor tissue ($P < 0.01$). The expressions of MMP-9 and TIMP-1 weren't related to patients' age, tumors' size and histologic types, but with histologic grade, the proportionality of MMP-9/TIMP-1 increased obviously with growing malignant potential of ovarian adenocarcinoma. **Conclusion** The expression of MMP-9 and TIMP-1 may play an important role in the development of malignant epithelial ovarian tumor, which may serve as a marker for diagnosis in borderline and ovarian adenocarcinoma. Tissue microarray is an efficient, low consume and strong comparability technique in study of human pathology.

Key words : Ovarian neoplasm; Matrix Metalloproteinase-9; Tissue inhibitor of metalloproteinase-1; Immunohistochemistry; Tissue microarray

摘 要: **目的** 研究基质金属蛋白酶-9(MMP-9)及其组织基质金属蛋白抑制剂-1(TIM P-1)在卵巢上皮性肿瘤中的表达及其临床意义。**方法** 应用组织微阵列技术结合免疫组化(S-P法)检测94例卵巢上皮性肿瘤组织中MMP-9和TIMP-1的表达。**结果** 卵巢癌组织和卵巢交界性肿瘤组织中MMP-9阳性表达率明显高于卵巢良性肿瘤($P < 0.01$);卵巢癌组织中TIMP-1阳性表达率明显高于卵巢良性肿瘤($P < 0.01$);MMP-9和TIMP-1表达与患者年龄、肿瘤大小和卵巢组织学类型均无明显相关性;在卵巢癌的病理分级中,MMP-9/TIMP-1比值随卵巢上皮性肿瘤恶性程度的增加明显增大。**结论** MMP-9和TIMP-1在卵巢上皮性肿瘤的演进发展中起重要作用,二者可作为卵巢上皮性肿瘤恶性的分子指标之一。组织微阵列是检测多样本组织的一种高效、低耗、可比性强的分子病理学研究工具。

关键词: 卵巢肿瘤;基质金属蛋白酶-9;组织基质金属蛋白酶抑制剂-1;免疫组化;组织微阵列

中图分类号: R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2005)08-0484-03

0 引言

组织微阵列(tissue microarray, TMA)又称组织微点阵,是1998年Kononen等^[1]在基因芯片、蛋白质芯片的启发下提出的又一种重要生物芯片技术。它可将数十、数百甚至上千个微小的不同临床组织集成到一张载玻片上制成有序的微缩组织切片,从而在一次实验中即可获得大量结果。我们采用组织微阵列技术制作卵巢上皮性肿瘤的组织微阵

列,并用免疫组织化学技术进行基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase 9, MMP-9)和组织金属蛋白酶抑制剂-1(tissue inhibitor of metalloproteinases 1, TIMP-1)的检测,探讨卵巢上皮性肿瘤组织中MMP-9和TIMP-1的表达意义。

1 资料与方法

1.1 临床资料

收集大连市妇产医院和大连市中心医院1999年1月~2002年12月间手术切除的卵巢上皮性肿瘤组织标本,共94例。患者年龄22~71岁,中位年

收稿日期:2004-10-09;修回日期:2004-11-26

作者单位:1. 418000 湖南省怀化医学高等专科学校基础医学部;2. 大连医科大学中日临床病理中心(*通讯作者)

龄 46 岁。94 例中,上皮性卵巢癌 60 例,卵巢交界性肿瘤 18 例,卵巢良性肿瘤 16 例。全部病例均经病理专家复诊并按《阿克曼外科病理学》第八版分类标准进行病理组织学分类和病理分级^[12]。组织学类型:浆液性囊腺癌 16 例,黏液性囊腺癌 20 例,子宫内膜样癌 12 例,透明细胞癌 12 例。病理分级:1 级 20 例,2 级 31 例,3 级 9 例。所有标本经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,4 μ m 切片。

1.2 组织微阵列制作

自制打孔针和取材针:选取临床穿刺针进行打磨,制成直径为 1.0mm 的薄壁平口打孔针和取材针。制备受体蜡模:先制作空白受体蜡块,再用自制打孔针进行手工单孔制胚,根据实验标本量排成 8 \times 6 孔数的长方形阵列。定位供体组织标本:由两位病理专家进行 HE 病理切片观察确定取材区域,在相应供体石蜡标本上准确标出取材部位。制备组织微阵列:用自制取材针在已标记的供体蜡块上钻取深约 2~3mm 的组织条,将组织条植入已打孔的受体蜡模并进行编号记录后,置 52 \pm 1 的烤箱内连续烘烤 2~3h,使供体组织条与受体蜡模完全融为一体(植入时注意在阵列起始第一孔不放入组织以便定位)。切片与铺片:将已制备好的组织微阵列连续 4 μ m 厚切片,裱贴于经多聚赖氨酸处理过的载玻片上,37 $^{\circ}$ C 恒温箱中放置 12h,常温保存备用。

1.3 组织微阵列免疫组化标记

免疫组化染色采用链酶素-卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物(SP)法。鼠抗人 MMP-9 单克隆抗体、鼠抗人 TIMP-1 多克隆抗体及 SP 免疫组化试剂盒购自福州迈新生物技术有限公司。主要染色步骤参照试剂盒说明书进行,TIMP-1 抗原修复采用煮沸法。以已知阳性片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.4 结果判定

以肿瘤细胞胞质出现棕黄色或棕红色颗粒判定为阳性(见图 1、2),按照 Shimizu 等^[3]的方法,综合染色强度和着色面积进行半定量结果判定。所有免疫染色结果均用双盲法测定。

1.5 统计学处理

所有数据均用 SPSS 10.0 统计软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 卵巢上皮性肿瘤组织中 MMP-9 和 TIMP-1 的表达(见表 1)

MMP-9 在卵巢癌和卵巢交界性肿瘤组织中阳

性表达率分别为 73.3% 和 55.6%,均显著高于卵巢良性肿瘤中 MMP-9 的表达,差异有极显著性($P <$

表 1 MMP-9 和 TIMP-1 在卵巢上皮性肿瘤中的表达

组织来源	n	MMP-9 阳性		TIMP-1 阳性	
		n	%	n	%
良性肿瘤	16	2	12.5	2	12.5
交界性肿瘤	18	10	55.6 ^b	6	33.3
卵巢癌	60	44	73.3 ^b	40	66.7 ^b

注:与良性肿瘤比较,^b $P < 0.01$

0.01)。MMP-9 阳性颗粒呈棕黄色,主要位于肿瘤细胞的胞质内,阳性表达呈弥漫性或灶性分布,在细胞间质有时出现弱阳性反应。卵巢癌中 TIMP-1 的阳性表达率为 66.7%,明显高于卵巢良性肿瘤,差异有极显著性($P < 0.01$)。TIMP-1 阳性颗粒呈棕红色或棕褐色,主要位于肿瘤细胞的胞质内,阳性表达呈弥漫型分布,在细胞间质多出现阳性反应。

2.2 卵巢癌中 MMP-9、TIMP-1 蛋白表达及其比值变化(见表 2)

表 2 MMP-9 和 TIMP-1 在卵巢癌不同病理分级和组织学类型中的表达

临床病理因素	n	MMP-9 阳性		TIMP-1 阳性	
		n	%	n	%
病理学分级					
G1	20	13	65.0	14	70.0
G2	31	23	74.2	20	64.5
G3	9	8	88.9	5	55.6
组织学类型					
浆液性囊腺癌	16	10	62.5	9	56.3
黏液性囊腺癌	20	17	85.0	16	80.0
子宫内膜样癌	12	8	66.7	8	66.7
透明细胞癌	12	9	75.0	7	58.3

卵巢癌组织中 MMP-9 和 TIMP-1 蛋白表达在不同年龄、肿瘤大小、病理分级和组织学类型之间比较,差异无显著性($P > 0.05$)。MMP-9/TIMP-1 在不同年龄、肿瘤大小、和组织学类型之间比较,差异无显著性($P > 0.05$),但在卵巢癌的不同病理分级中 MMP-9/TIMP-1 之比分别为 G1 0.93、G2 1.15 和 G3 1.60, MMP-9/TIMP-1 之比在 G1 最低,随着卵巢上皮性肿瘤恶性程度的增加比值明显增大($P < 0.05$)。

3 讨论

自从 1998 年 Kononen 等提出组织微阵列的概念后,它就作为生命科学中进行原位组织学研究的重要技术引起广泛重视,并逐渐成为分子病理学家看好的重要研究工具。Bubendorf 等^[14]制作了包含 371 个不同前列腺癌标本的组织直径为 0.6mm 的组

组织微阵列研究前列腺癌的发展及演进。Rao 等^[5]利用包含 1208 个不同膀胱癌标本的组织微阵列研究 E-Cadherin 和 Gelsolin 等骨架蛋白表达的改变与膀胱癌复发之间的关系。Wang 等^[6]利用组织微阵列技术,研究了乙肝表面抗原在 194 例肝癌组织及其癌旁组织中的表达。应用组织微阵列既可做 HE 染色、特殊染色和免疫组织化学染色,也可做 DNA 和 RNA 分子原位杂交、荧光原位杂交。它通过一次实验即可获得大量结果,具有高效、快速、低消耗的特点,而且对一次实验所获结果进行平行分析,可比性强,结果更具标准化。

我们通过自制简易组织微阵列对 94 例卵巢上皮性肿瘤组织进行 MMP-9 和 TIMP-1 的免疫组化检测,结果仅用几张切片即完成了全部实验,且染色背景清晰,很少出现边缘现象。极大节约了研究经费和降低了制作成本及劳动量,而且在最短的时间内获得了 MMP-9 和 TIMP-1 在卵巢上皮性肿瘤组织中表达的全部数据。

通过对自制组织微阵列的免疫组化染色,显示 MMP-9 在卵巢癌和卵巢交界性肿瘤中的阳性表达率均显著高于卵巢良性肿瘤 ($P < 0.01$),且随卵巢上皮性肿瘤恶性程度的增加 MMP-9 阳性表达不断增强,提示 MMP-9 在卵巢肿瘤的恶性演进发展过程中可能发挥重要作用。这与 Schmalfeldt 等^[7]报道 MMP-9 的表达增强与卵巢癌的恶性发展有关相一致。MMP-9 作为明胶酶的一种,能降解明胶蛋白、和型胶原、蛋白聚糖等构成 ECM 的重要成分,破坏 ECM 屏障,促使肿瘤细胞发生侵袭和转移。同时 MMP-9 通过参与肿瘤血管的生成进一步促进原发性肿瘤生长。TIMP-1 作为 MMP-9 特异性抑制物,在调控 MMP-9 活性中起着非常重要的作用。许多研究提示^[8,9],MMP-9 和 TIMP-1 之间的相对平衡状态是决定 ECM 是否被降解的关键,这种平衡状态的破坏往往促进肿瘤发生发展。本研究结果发现,TIMP-1 在卵巢癌中的阳性表达率明显高于卵巢良性肿瘤 ($P < 0.01$),即与 MMP-9 变化同步,显示 TIMP-1 是 MMP-9 的天然抑制剂,但随着卵巢上皮性肿瘤恶性程度的加深 TIMP-1 阳性表达呈下降趋势,从 G₁ 期到 G₃ 期,MMP-9/TIMP-1

的比值明显上升,提示在卵巢癌的演进发展过程中,TIMP-1 呈相对低水平表达,对 MMP-9 的抑制作用可能减弱,不能有效限制 MMP-9 酶活性的增强,ECM 被进一步降解,最终导致基底膜破损,瘤细胞移出。

本研究未发现 MMP-9 和 TIMP-1 表达与患者年龄、肿瘤大小和卵巢组织学类型分类有明显相关性。MMP-9 和 TIMP-1 是否可以作为估计预后的指标,我们将作进一步的追踪报导。

(本文图见封 3)

参考文献:

- [1] Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens[J]. Nat Med, 1998, 4(7): 844-847.
- [2] Juan Rosai 原著, 回允中主译. 阿克曼外科病理学[M]. 第 8 版. 辽宁: 辽宁教育出版社, 1999. 1474-1475.
- [3] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of H-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissues[J]. Hum Pathol. 1990, 21(6): 607-612.
- [4] Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, et al. Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughput fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays[J]. Cancer Res, 1999, 59(4): 803-806.
- [5] Rao J, Seligson D, Visapaa H, et al. Tissue microarray analysis of cytoskeletal actin-associated biomarkers gelsolin and E-cadherin in urothelial carcinoma[J]. Cancer, 2002, 95(6): 1247-1257.
- [6] Wang Y, Wu MC, Sham JS, et al. Different expression of hepatitis B surface antigen between hepatocellular carcinoma and its surrounding liver tissue, studied using a tissue microarray[J]. Cancer, 2002, 197(5): 610-616.
- [7] Schmalfeldt B, Prechtel D, Harting K, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer[J]. Clin Cancer Res, 2001, 7(8): 2396-2404.
- [8] Schultz RM, Silberman S, Persky B, et al. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinases of human amnion invasion and lung colonization by murine B16F10 melanoma cells[J]. Cancer Res, 1992, 52(3): 701-708.
- [9] 王喜梅, 孙雷, 刘逢吉, 等. 甲状腺乳头状癌 MMP-2、MMP-9、TIMP-1 和 TIMP-2 表达对肿瘤侵袭转移的影响[J]. 实用癌症杂志, 2004, 19(2): 133-135.

[编辑: 安 凤]

组织蛋白酶L在骨肉瘤组织中的表达及意义

(正文见 525 页)

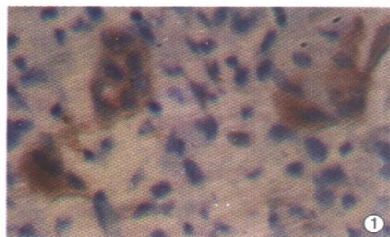


图1 组织蛋白酶L在骨肉瘤组织中的表达 $\times 400$

乳腺浸润性导管癌组织中 HPV16 DNA 与 p53 蛋白表达的研究

(正文见 479 页)

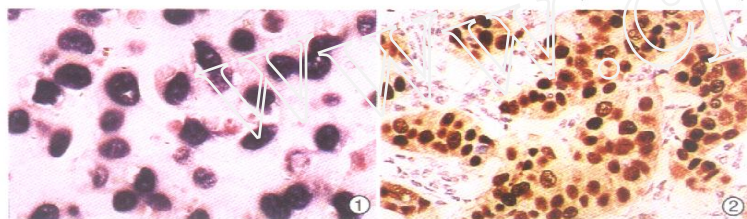


图1 乳腺浸润性导管癌细胞核内 HPV16DNA 阳性标记信号呈现紫蓝色 (ISH $\times 1000$)

图2 乳腺浸润性导管癌细胞核内 p53 蛋白阳性棕黄色颗粒 (SP $\times 200$)

应用组织微阵列技术研究 MMP-9 与 TIMP-1 在卵巢上皮性肿瘤中的表达及临床意义

(正文见 484 页)

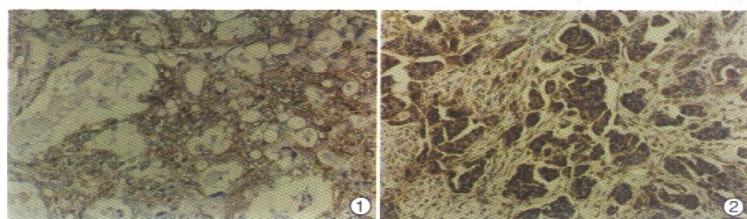


图1 MMP-9 在卵巢黏液性囊腺癌中的表达, 胞质阳性反应 (SP $\times 100$)

图2 TIMP-1 在卵巢浆液性囊腺癌中的表达, 胞质阳性反应 (SP $\times 100$)

MRP、LRP 在人大肠癌组织中的表达及临床意义

(正文见 499 页)



图1 大肠癌细胞中 MRP 阳性表达 (SP $\times 100$)

图2 大肠癌细胞中 LRP 阳性表达 (SP $\times 100$)