

# 胰腺癌组织中表皮生长因子受体、基质金属蛋白酶9的表达及其意义

魏礼清<sup>1</sup>, 向春香<sup>2</sup>, 刘水逸<sup>1</sup>, 卢忠心<sup>1</sup>

**Expression and Significance of Epidermal Growth Factor Receptor and Matrix Metalloproteinase-9 in Pancreatic Carcinoma Tissues**

WEI Liqing<sup>1</sup>, XIANG Chunxiang<sup>2</sup>, Liu Shuiyi<sup>1</sup>, LU Zhongxin<sup>1</sup>

1. Department of Clinical Laboratory, The Central Hospital of Wuhan, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430014, China, 2. Department of Pathology

Corresponding Author: LU Zhongxin, E-mail: lzx71@yahoo.com

**Abstract: Objective** To discuss the expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in pancreatic carcinoma tissues, and its relationship with clinicopathologic features of pancreatic carcinoma. **Methods** Expression of EGFR and MMP-9 were detected by immunohistochemistry in surgically resected specimens (cancer tissues, cancer adjacent tissues and normal tissues) from 44 pancreatic carcinoma patients, 13 chronic pancreatitis patients and 7 normal patients. The results were analyzed combined with clinicopathologic characteristics. **Results** There was no expression of EGFR or MMP-9 in normal pancreatic tissues. The expression of EGFR and MMP-9 in chronic pancreatitis tissues were 23.1% (3/13) and 15.4% (2/13). The expression of EGFR and MMP-9 in cancer tissues were higher than those in cancer adjacent tissues (61.4% vs. 34.1%, 54.5% vs. 29.5%,  $P < 0.05$ ). Both expression of EGFR, MMP-9 in cancer tissues and adjacent tissues were significantly higher than those in tissues of normal pancreas and chronic pancreatitis (all  $P < 0.05$ ). There were positive correlation between EGFR, MMP-9 expression and superior mesenteric vessels invasion, lymph node metastasis, clinical stage, differentiation of tumor. **Conclusion** The expression of EGFR and MMP-9 are closely correlated in pancreatic carcinoma tissues, and could be the index for learning biological behavior and prognosis of pancreatic carcinoma.

**Key words:** Pancreatic carcinoma; Epidermal growth factor receptor; Matrix metalloproteinase-9

**摘要: 目的** 探讨胰腺癌组织中表皮生长因子受体(EGFR)、基质金属蛋白酶9(MMP-9)的表达及其与胰腺癌临床病理特征的关系。**方法** 应用免疫组织化学SP法检测44例胰腺癌、相应癌旁胰腺组织、13例慢性胰腺炎和7例正常胰腺组织中EGFR、MMP-9的表达,并分析其与临床病理特征的相关性。**结果** 正常胰腺组织中均无EGFR及MMP-9的表达。慢性胰腺炎组织中EGFR、MMP-9的阳性表达率分别为23.1%(3/13)和15.4%(2/13)。胰腺癌组织中EGFR、MMP-9的阳性表达率分别为61.4%(27/44)和54.5%(24/44);相应癌旁组织中的阳性表达率分别为34.1%(15/44)和29.5%(13/44)。胰腺癌组织中的EGFR及MMP-9阳性表达率均显著高于相应癌旁组织( $P < 0.05$ );胰腺癌组织及癌旁组织中EGFR及MMP-9的表达均显著高于慢性胰腺炎组织和正常胰腺组织( $P$ 均 $< 0.05$ )。EGFR和MMP-9的表达与胰腺癌临床分期、分化程度、血管侵犯及淋巴结转移相关。**结论** 胰腺癌组织中EGFR的表达与MMP-9表达密切相关,EGFR的表达与MMP-9的表达水平可作为了解胰腺癌生物学行为和判断预后的指标。

**关键词:** 胰腺肿瘤; 表皮生长因子受体; 基质金属蛋白酶-9

**中图分类号:** R735.9 **文献标识码:** A

## 0 引言

胰腺癌是恶性肿瘤中死亡率最高的一种,其

五年生存率仅4%,其发病机制未完全明了。肿瘤的形成涉及肿瘤细胞的增殖、分化及细胞外基质自然屏障的破坏等有关,其中表皮生长因子(EGFR)和基质金属蛋白酶9(MMP-9)在肿瘤发生、发展过程中起重要作用<sup>[1-4]</sup>。本研究检测EGFR、MMP-9在胰腺癌组织中的表达,探讨它们与胰腺癌临床病理特征和预后的关系。

收稿日期: 2014-01-14; 修回日期: 2014-02-24

作者单位: 1. 430014 武汉, 华中科技大学同济医学院附属武汉中心医院检验科, 2. 病理科

通信作者: 卢忠心, E-mail: lzx71@yahoo.com

作者简介: 魏礼清(1982-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事肿瘤生物学的研究

## 1 资料与方法

### 1.1 临床资料

收集2006年2月至2012年8月间武汉市中心医院肝胆胰外科经手术及病理证实的44例胰腺癌标本, 其中男25例, 女19例, 患者年龄为42~78岁, 平均 $(62.1 \pm 7.9)$ 岁。分期标准根据2002年美国癌症联合研究会(AJCC)制定的TNM分期: I~II期21例, III~IV期23例。肿瘤部位: 胰头部24例, 胰体尾部20例。淋巴结阳性19例, 淋巴结阴性25例。组织学分级: 高分化腺癌15例, 中分化腺癌22例, 低分化腺癌7例。以同期病理证实的13例慢性胰腺炎和7例正常胰腺组织标本作为对照。

### 1.2 免疫组织化学染色

使用即用型免疫组化检测试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司)检测EGFR、MMP-9的表达, 按照试剂盒说明书操作。抗EGFR、MMP-9一抗购自武汉博士德生物工程有限公司。胰腺癌组织均经中性福尔马林固定, 梯度乙醇溶液脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 制成蜡块。连续切片每张厚度4~6  $\mu\text{m}$ , 免疫组织化学法染色采用SP二步法进行, 具体操作参照说明书。MMP-9采用高温高压柠檬酸修复, EGFR用胃蛋白酶修复, 最后用DAB显色。以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作阴性对照, 已知阳性切片为阳性对照。在光学显微镜下结合HE切片观察免疫组织化学切片的显色反应。结果判定采用双盲法, 每组均设有阳性和阴性对照。每张切片随机选取10个高倍视野, 每个视野计数100个肿瘤细胞, 计算阳性细胞数的百分比: 5%~25%为1分; >25%~50%为2分; >50%~75%为3分; >75%为4分。染色强度分为: 淡黄色为1分; 黄或深黄色为2分; 褐或棕褐色为3分。两者计分相乘大于1为阳性。EGFR阳性染色为淡黄色、棕黄色或棕褐色, 定位于细胞质和(或)细胞膜, MMP-9阳性染色为胞质内染成淡黄色至棕褐色。

### 1.3 统计学方法

应用SPSS 18.0统计软件包处理数据, 采用 $\chi^2$ 检验和配对资料的Spearman等级相关分析法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 EGFR和MMP-9在各胰腺组织中的表达

7例正常胰腺组织中均无EGFR及MMP-9的表达, 13例慢性胰腺炎组织中EGFR、MMP-9阳性表达率分别为23.1%(3/13)和15.4%(2/13)。胰腺癌组织中EGFR、MMP-9的阳性表达率分别为61.4%(27/44)和54.5%(24/44); 相应癌旁组织的阳性表达率分别为34.1%(15/44)和29.5%(13/44), 见图1。胰腺癌组织中的EGFR及MMP-9阳性表达率均显著高于相应癌旁组织( $P < 0.05$ )。且胰腺癌组织及癌旁组织中EGFR及MMP-9的表达均显著高于慢性胰腺炎组织和正常胰腺组织( $P$ 值均 $< 0.05$ )。

### 2.2 胰腺癌组织中EGFR和MMP-9的表达与临床病理特征的关系

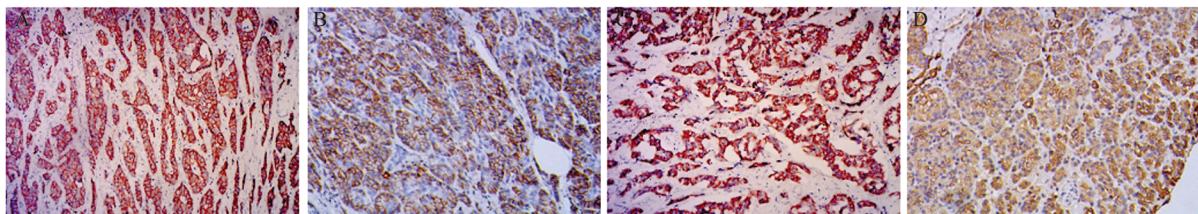
胰腺癌组织中EGFR和MMP-9的表达与患者性别、年龄及肿瘤部位、大小均无关, 而与肿瘤的血管侵犯、淋巴结转移、分化程度、分期有关( $P$ 值均 $< 0.05$ ), 见表1。

### 2.3 EGFR与MMP-9蛋白在胰腺癌组织中表达的相关性分析

EGFR阳性表达率高的病例组MMP-9的阳性率也高, 反之亦然。配对资料的Spearman相关分析显示, EGFR表达与MMP-9表达呈正相关( $r = 0.307, P < 0.05$ )。

## 3 讨论

EGFR家族属于酪氨酸激酶受体大家族, 是原癌基因(c-erbB-1)的表达产物, 作为一种跨膜糖蛋白, 当配体结合于受体的胞外区后, 引起受体胞内区自身磷酸化并激活胞内酪氨酸激酶, 当配



A,B:the positive EGFR expression was detected in the plasmalemma of pancreatic carcinoma(A) and adjacent tissues(B); C,D:the positive MMP-9 expression was detected in the cytoplasm of pancreatic carcinoma(C)and adjacent tissues(D)

图1 胰腺癌及癌旁组织中EGFR和MMP-9的表达(SP  $\times 200$ )

Figure1 Expression of EGFR and MMP-9 in pancreatic carcinoma and adjacent tissues(SP  $\times 200$ )

表1 EGFR、MMP-9的表达与胰腺癌临床病理特征的关系

Table1 Relationship between EGFR, MMP-9 expression and clinicopathologic parameters of pancreatic carcinoma

| Clinicopathologic parameters | n  | EGFR+[n(%)] | $\chi^2$ | P     | MMP-9+[n(%)] | $\chi^2$ | P     |
|------------------------------|----|-------------|----------|-------|--------------|----------|-------|
| Gender                       | 44 |             |          |       |              |          |       |
| Male                         | 25 | 17(68.0)    | 1.075    | 0.300 | 15(60.0)     | 0.695    | 0.405 |
| Female                       | 19 | 10(52.6)    |          |       | 9(47.4)      |          |       |
| Age(years)                   |    |             |          |       |              |          |       |
| <48                          | 10 | 5(50.0)     | 0.705    | 0.638 | 7(70.0)      | 1.247    | 0.450 |
| ≥48                          | 34 | 22(64.7)    |          |       | 17(50.0)     |          |       |
| Location                     |    |             |          |       |              |          |       |
| Head                         | 24 | 14(58.3)    | 0.205    | 0.651 | 12(50.0)     | 0.440    | 0.507 |
| Body and tail                | 20 | 13(65.0)    |          |       | 12(60.0)     |          |       |
| Diameter(cm)                 |    |             |          |       |              |          |       |
| ≥2                           | 26 | 17(65.4)    | 0.433    | 0.510 | 14(53.8)     | 0.013    | 0.911 |
| <2                           | 18 | 10(55.6)    |          |       | 10(55.6)     |          |       |
| Mesenteric vascular invasion |    |             |          |       |              |          |       |
| Yes                          | 17 | 14(82.4)    | 5.148    | 0.023 | 14(82.4)     | 12.682   | 0.003 |
| No                           | 27 | 13(48.1)    |          |       | 10(37.0)     |          |       |
| Lymph node metastasis        |    |             |          |       |              |          |       |
| Yes                          | 19 | 16(84.2)    | 7.362    | 0.007 | 16(84.2)     | 11.869   | 0.001 |
| No                           | 25 | 11(44.0)    |          |       | 8(32.0)      |          |       |
| Differentiation              |    |             |          |       |              |          |       |
| High                         | 15 | 5(33.3)     | 7.920    | 0.019 | 4(26.7)      | 8.178    | 0.017 |
| Moderate                     | 22 | 16(72.7)    |          |       | 14(63.6)     |          |       |
| Low                          | 7  | 6(85.7)     |          |       | 6(85.7)      |          |       |
| TNM stage                    |    |             |          |       |              |          |       |
| I + II                       | 21 | 9(42.9)     | 5.803    | 0.016 | 8(38.1)      | 4.385    | 0.036 |
| III + IV                     | 23 | 18(78.3)    |          |       | 16(69.6)     |          |       |

体与细胞表面的受体结合后，激活其下游信号通路进而刺激肿瘤的转化、增殖和转移以及血管发生等<sup>[5]</sup>。EGFR在许多肿瘤过表达或突变，导致肿瘤细胞生长失控和恶性程度增高，EGFR在乳腺癌、小细胞性肺癌、胆囊癌等多种肿瘤中存在过表达<sup>[6-8]</sup>。陈卫国等<sup>[9]</sup>发现通过小干扰RNA靶向抑制EGFR能够有效抑制前列腺癌的生长。有研究表明单独或联合应用一些阻滞EGFR信号转导通路的药物，可以明显抑制胰腺癌细胞的迁移和浸润<sup>[10-11]</sup>。本实验中检测了44例胰腺癌组织及其对应癌旁组织中EGFR蛋白的表达情况，胰腺癌中EGFR的表达率为61.4%，表达高于配对癌旁组织、慢性胰腺炎组织及正常胰腺组织的表达 ( $P<0.05$ )，说明EGFR信号通路在胰腺癌组织中呈活化状态。

MMPs是一组依赖于锌离子的能降解细胞外基质的内肽酶家族，其主要作用是降解基质中的蛋白，MMP-9是其家族中的一员<sup>[12]</sup>。MMP-9属于IV型胶原降解酶，是降解细胞外基质的主要酶类之一，IV型胶原酶通过对基膜中IV型胶原与层黏连蛋白、纤维连接蛋白、蛋白多糖等物质的降解，使这些屏障消失，从而促进肿瘤对周围组织的侵袭<sup>[13]</sup>。Fujisawa等<sup>[4]</sup>在胰腺癌的小鼠模型中发现巯乙胺通过下调MMP-9等基质金属蛋白酶的表达能够抑制肿瘤的侵袭、迁移，并增加胰腺癌

小鼠的存活率。本实验中检测了44例胰腺癌组织及其对应癌旁组织中MMP-9的表达情况，胰腺癌中MMP-9的表达率为54.5%，明显高于配对癌旁组织、慢性胰腺炎组织及正常胰腺组织中的表达 ( $P<0.05$ )，说明MMP-9可能与胰腺癌的发生发展有关。

本研究结果表明，EGFR和MMP-9蛋白表达与患者性别、年龄、肿瘤大小和肿瘤部位等病理因素均无明显相关，而与血管侵犯、淋巴结转移状况和肿瘤TNM分期有关。肠系膜上血管和淋巴结转移阳性、分化程度较低和分期较晚的病例组，EGFR和MMP-9蛋白表达阳性率显著升高，差异有统计学意义。Spearman相关分析显示，EGFR和MMP-9蛋白表达呈正相关，说明MMP-9和EGFR蛋白信号通路之间存在一定联系，其作用机制尚未明了。Lue等<sup>[14]</sup>研究发现MMP-9可能参与激活EGFR信号途径，在前列腺癌细胞上皮-间质转化过程中增加锌离子运载体LIV-1的表达增强了肿瘤细胞的迁移侵袭和转移能力，LIV-1的表达活了化EGFR-ERK信号途径。LIV-1诱导MMP-9等表达的上调，而MMP-9等可以使膜结合的HB-EGF分离出来，HB-EGF作为EGFR上游因子从细胞表面释放，可溶性的HB-EGF引起EGFR的磷酸化和其下游的ERK信号途径的活化。因此，MMP-9可



能参与释放EGFR上游信号因子过程,进而启动EGFR信号通路,促进胰腺癌的发生发展。淋巴结转移和肿瘤分期是判断肿瘤患者预后的重要指标,本研究结果再次证明淋巴结转移和TNM分期在判断胰腺癌预后方面起到不可替代的作用。不同的患者即使处于同一分期或同一状态,其预后依然存在差异,分子生物学标志物目前已成为判断胰腺癌预后的重要指标。本研究表明,EGFR和MMP-9蛋白在胰腺癌组织中均呈高表达,两者与胰腺癌的发生密切相关,联合检测EGFR和MMP-9表达,更能准确反映胰腺癌的生物学特性。EGFR和MMP-9蛋白可以作为胰腺癌诊断和预后判断的分子标志物,因此在胰腺癌的防治中可能有良好的应用前景。

#### 参考文献:

- [1] Brand TM, Iida M, Li C, *et al.* The nuclear epidermal growth factor receptor signaling network and its role in cancer[J]. *Discov Med*, 2011, 12(66):419-32.
- [2] Ardito CM, Grüner BM, Takeuchi KK, *et al.* EGF receptor is required for KRAS-induced pancreatic tumorigenesis[J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(3):304-17.
- [3] He XJ, Jiang XT, Ma YY, *et al.* REG4 contributes to the invasiveness of pancreatic cancer by upregulating MMP-7 and MMP-9[J]. *Cancer Sci*, 2012, 103(12):2082-91.
- [4] Fujisawa T, Rubin B, Suzuki A, *et al.* Cysteamine suppresses invasion, metastasis and prolongs survival by inhibiting matrix metalloproteinases in a mouse model of human pancreatic cancer[J]. *PLoS One*. 2012, 7(4):e34437.
- [5] Biswas DK, Cruz AP, Gansberger E, *et al.* Epidermal growth factor-induced nuclear factor kappa B activation: A major pathway of cell-cycle progression in estrogen receptor negative breast cancer cells[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(15):8542-7.
- [6] Sergeant G, Lerut E, Ectors N, *et al.* The prognostic relevance of tumor hypoxia markers in resected carcinoma of the gallbladder[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2011, 37(1):80-6.
- [7] Buck E, Eyzaguirre A, Brown E, *et al.* Rapamycin synergizes with the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib in non-small-cell lung, pancreatic, colon, and breast tumors[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(11):2676-84.
- [8] Rocha-Lima CM, Soares HP, Raez LE, *et al.* EGFR targeting of solid tumors[J]. *Cancer Control*, 2007, 14(3):295-304.
- [9] Chen WG, Long HM, Hou JQ, *et al.* Effects of gefitinib and small interfering RNAs targeting EGFR in the treatment of prostate cancer[J]. *Zhonghua Shi Yan Wai Ke Za Zhi*, 2010, 3(27):325-7, back insert 2. [陈卫国, 龙慧民, 侯建全, 等. 吉非替尼和靶向表皮生长因子受体小干扰RNA治疗前列腺癌[J]. *中华实验外科杂志*, 2010, 27(3):325-7, 后插2页.]
- [10] Walsh N, Kennedy S, Larkin A, *et al.* EGFR and HER2 inhibition in pancreatic cancer[J]. *Invest New Drugs*, 2013, 31(3):558-66.
- [11] Nagaraj NS, Washington MK, Merchant NB. Combined blockade of Src kinase and epidermal growth factor receptor with gemcitabine overcomes STAT3-mediated resistance of inhibition of pancreatic tumor growth[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(3):483-93.
- [12] Mysliwiec AG, Ornstein DL. Matrix metalloproteinases in colorectal cancer[J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2002, 1(4):208-19.
- [13] Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, *et al.* Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen[J]. *Nature*, 1980, 284(5751):67-8.
- [14] Lue HW, Yang X, Wang R, *et al.* LIV-1 promotes prostate cancer epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis through HB-EGF shedding and EGFR-mediated ERK signaling[J]. *PLoS One*, 2011, 6(11):e27720.

[编辑: 周永红; 校对: 刘红武]