

结肠癌中P15, P16与MMP-9的表达及其相关性

张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉

张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉, 河北医科大学第二医院胃肠外科 河北省石家庄市 050000
通讯作者: 张占学, 050000, 河北省石家庄市和平西路215号, 河北医科大学第二医院胃肠外科. zhangzx0268@eyou.com
电话: 0311-86377526
收稿日期: 2006-10-11 接受日期: 2006-10-27

Expression of P15, P16 and matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer

Zhan-Xue Zhang, Wei-Qing Song, Qing-Hui Yan, Bao-Jun Zhou, Jian-Hui Cai

Zhan-Xue Zhang, Wei-Qing Song, Qing-Hui Yan, Bao-Jun Zhou, Jian-Hui Cai, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China
Correspondence to: Zhan-Xue Zhang, Department of Gastrointestinal Surgery, the Second Affiliated Hospital of Hebei Medical University, 215 Heping Road, Shijiazhuang 050000, Hebei Province, China. zhangzx0268@eyou.com
Received: 2006-10-11 Accepted: 2006-10-27

Abstract

AIM: To investigate the expression of P15/P16 and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as well as their relationships with the clinicopathological characteristics in colorectal cancer.

METHODS: Immunohistochemistry was used to detect the expression of P15, P16 and MMP-9 in 50 specimens of colorectal cancer tissues, tissues 3 cm away from cancer, and normal tissues from resection margin.

RESULTS: The positive rates of P15 (84% vs 100%, $P < 0.05$), P16 (76% vs 100%, $P < 0.05$) and MMP-9 expression (82% vs 0, $P < 0.05$) were 84%, 76% and 82.00% in colorectal cancer tissues, 94%, 90% and 44% in the tissues 3 cm away from cancer, and 100%, 100% and 0, respectively, and there were significant differences among the three kinds of tissues ($P < 0.05$). The expression of P15/P16 and MMP-9 were markedly associated with the histological types, clinical stages and lymphatic metastases. Moreover, MMP-9 expression was negatively correlated with P15 and P16 expression ($r = -0.834$, P

< 0.05 ; $r = -0.752$, $P < 0.05$).

CONCLUSION: Down-regulation of P15/P16 expression and up-regulation of MMP-9 play important roles in the invasion and metastasis of colorectal cancer, which can help to make judgement for metastasis and prognosis.

Key Words: Colorectal cancer; P15; P16; Matrix metalloproteinase-9; Immunohistochemistry

Zhang ZX, Song WQ, Yan QH, Zhou BJ, Cai JH. Expression of P15, P16 and matrix metalloproteinase-9 in colorectal cancer. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2006;14(36):3521-3524

摘要

目的: 研究P15, P16和MMP-9在结肠癌及正常组织中的表达, 并探讨其与临床病理学特征的关系。

方法: 采用免疫组化法检测50例结肠癌组织、癌旁3cm组织及切缘正常组织中P15、P16和MMP-9表达的差异。

结果: 肿瘤、癌旁3cm与切缘正常组织中, P15的阳性表达率分别为84%、94%和100%, P16的阳性表达率分别为76%、90%和100%, MMP-9的阳性表达率分别为82%、44%和0, 均有显著性差异($P < 0.05$)。P15, P16和MMP-9的表达与结肠癌的分化程度、Dukes分期和淋巴结转移均有显著相关。结肠癌组织中MMP-9与P15、P16呈负相关性($r = -0.834$, $P < 0.05$; $r = -0.752$, $P < 0.05$)。

结论: P15, P16表达的下调和MMP-9表达上调将促进结肠癌浸润和转移, 二者在癌组织中表达的高低是结肠癌细胞重要的恶性生物学特征, 有助于对结肠癌转移及患者预后的判断。

关键词: 结肠癌; P15; P16; MMP-9; 免疫组化

张占学, 宋伟庆, 闫庆辉, 周保军, 蔡建辉. 结肠癌中P15, P16与MMP-9的表达及其相关性. *世界华人消化杂志* 2006;14(36):3521-3524
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/14/3521.asp>

■背景资料

细胞增殖周期受细胞周期素依赖性激酶(CDKS)调节, 受其抑制因子(CDKIS)的作用而失活, P16, P15蛋白是CDKIS中的两种, P16, P15蛋白可特异地与CDK4/6或cyclinD1 CDK4/6复合物结合, 抑制Cdk4/6的活性, 抑制细胞由G1期进入S期。研究表明P16, P15高表达可能抑制肿瘤淋巴结转移, 提示检测P16, P15对于肿瘤转移预测及预后评估具有一定帮助作用。基质金属蛋白酶MMP-9能降解基底膜和细胞外基质成分, 可促进癌细胞对周围组织的浸润和转移。

■创新盘点

国内外对P15、P16和MMP-9在结肠癌中的研究尚处于起步阶段,且缺乏判断结肠癌预后的简单有效的方法。本课题以结肠癌为研究对象,首次将两类与肿瘤转移密切相关的指标进行联合检测,进一步证实P15、P16和MMP-9与肿瘤临床病理及预后的关系以及两者之间的关系,为结肠癌的临床治疗及判断预后开辟了一条崭新的道路。

0 引言

P15和P16为抑癌基因,同属于周期依赖性激酶抑制因子(CDKI)基因家族,定位于人染色体9p21,编码的蛋白质能以相似的方式抑制cyclin-Cdk4/6复合物对PRb蛋白的磷酸化作用,进而阻止细胞周期通过G1/S检验点,在调节细胞增殖与凋亡、阻止有DNA损伤的细胞进行分裂增殖中具有关键的作用。MMP-9为基质金属蛋白酶家族(matrix metalloproteinases, MMPs)成员之一,能有效分解基底膜的主要成分IV型胶原蛋白,其过度表达与人类多种恶性肿瘤侵袭转移潜能及预后密切相关。在结肠癌中同时进行P15、P16和MMP-9与肿瘤侵袭、转移的研究报道少见,本研究目的就在于通过免疫组织化学方法,对P15、P16和MMP-9在结肠癌中表达进行研究,探讨其与结肠癌浸润转移的关系,为结肠癌的诊断和治疗及判断预后提供有参考价值的分子生物学指标。

1 材料和方法

1.1 材料 收集我院结肠癌标本50例,其中男28例,女22例。年龄36-87(平均59.29)岁。术前未接受任何抗肿瘤治疗。术后病理为:腺癌28例,黏液腺癌11例,低分化癌和未分化癌11例。Dukes分期:A-B期27例、C-D期23例。取材部位为肿瘤、癌旁3 cm、标本切缘。所有标本均为手术切除新鲜标本,取材后中性甲醛固定,石蜡包埋,厚4 μ m连续切片,行HE及免疫组织化学染色。

1.2 方法 采用SP法,P15、P16和MMP-9试剂均购自Stanta Cruz公司。结果判定:胞核或胞质出现棕黄色颗粒者为阳性细胞。每张切片选择5个高倍视野,计数不少于500个细胞,取均数并评分:不着色为0分,着色淡为1分,着色深为2分;着色细胞占计数细胞百分率: $\leq 5\%$ 为0分,6%-25%为1分,26%-50%为2分, $\geq 51\%$ 为3分,染色程度与染色细胞百分率得分乘积为最后得分。0-1分为阴性病例,2分以上为阳性病例。

统计学处理 用SAS8.0软件进行 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 水平为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 P15、P16和MMP-9在结肠癌不同部位表达情况 在肿瘤组织、癌旁3 cm组织与切缘正常组织中,P15的阳性表达率分别为84.00%、94.00%和100.00%;P16的阳性表达率分别为76.00%、90.00%和100.00%,MMP-9的阳性表达率分别为82.00%、44.00%和0%,均有显著性差异($P<0.05$)

(表1)。

2.2 P15、P16和MMP-9与结肠癌临床病理特征的关系 P15、P16和MMP-9的表达与结肠癌的分化程度、Dukes分期和淋巴结转移均有显著相关(表2)。

2.3 P15、P16与MMP-9表达的相关性 结肠癌组织中P15阳性42例,其中MMP-9阳性34例,8例P15阴性的病例中7例MMP-9阳性,呈负相关($r = -0.834, P<0.05$);结肠癌组织中P16阳性38例,其中MMP-9阳性31例,12例P16阴性的病例中10例MMP-9阳性,呈负相关($r = -0.752, P<0.05$)。

3 讨论

细胞增殖周期受细胞周期素依赖激酶(CDKS)调节。CKDS与细胞周期素结合被活化,促进细胞增殖。受到其抑制因子(CDKIS)的作用而失活。P16、P15蛋白则是CDKIS中的两种。在正常细胞中,细胞周期素D1与CDK4或CDK6结合成复合物,使CDK4/6活化,从而可使细胞内的另一种调节蛋白-视网膜母细胞瘤(RB)蛋白磷酸化,继而释放结合的转录因子(E2F),使细胞由G1期进入S期。如果CDKS得不到抑制,则导致细胞不断增殖。P16、P15蛋白则可特异的与CDK4/6或cyclinD1 CDK4/6复合物结合,抑制CDK4/6的活性,使RB蛋白不能磷酸化,无法与E2F解离,基因转录受到抑制,从而抑制细胞由G1期进入S期^[1]。

肿瘤发生、发展是多阶段、多基因的综合过程,涉及多种癌基因激活和抑癌基因的失活,估计需有4-5个基因的异常变化,而且癌变与突变次序有关,并需要一定次数的积累。P16是公认的多种肿瘤抑制基因蛋白,在许多肿瘤与细胞株中高频率纯合子缺失,这种缺失消除了附近的第二个基因,可能就是P15。研究发现,P15与P16基因及其产物在许多人类原发肿瘤和细胞株发生缺失,并导致肿瘤细胞无限制生长^[2-6];李庚 *et al*^[7]研究表明P16基因甲基化后失活在大肠癌的发生发展中起重要作用。P15和P16基因在抑癌基因家族中的重要地位几乎得到了一致的肯定。

国内外学者对不同肿瘤中P15、P16蛋白的表达进行检测,结果发现,不同的肿瘤组织中P15、P16基因的缺失率不尽相同,有关结肠癌的报道较少,国内张远 *et al*^[8]报道结肠癌P16蛋白的表达率为78.9%。略低于我们的研究结果,但都能说明结肠癌中也存在P15、P16基因的缺失,这可能是部分结肠癌发生的原因。肖鹏 *et al*^[9]发

表 1 P15, P16和MMP-9在结肠癌不同部位表达情况 ($n = 50$)

分组	P15			P16			MMP-9		
	阳性	%	P	阳性	%	P	阳性	%	P
结肠癌组织	42	84.00	<0.05	38	76.00	<0.05	41	82.00	<0.05
癌旁3 cm	47	94.00		45	90.00		22	44.00	
切缘组织	100	100.00		100	100.00		0	0.00	

表 2 P15, P16和MMP-9与结肠癌临床病理特征的关系

病理参数	n	P15			P16			MMP-9		
		阳性	%	P	阳性	%	P	阳性	%	P
分化程度										
高分化	28	26	92.86	<0.05	24	85.71	<0.05	20	71.43	<0.05
中低分化	22	16	72.73		14	63.64		21	95.45	
肿瘤大小										
<5cm	21	19	90.48	>0.05	17	80.95	>0.05	18	85.71	>0.05
>5cm	29	23	79.31		21	72.41		23	79.31	
浸润深度										
未浸透浆膜	24	21	87.50	>0.05	22	91.67	<0.05	18	75.00	>0.05
浸透浆膜	26	21	80.77		16	61.54		23	88.46	
Dukes分期										
A-B	27	26	96.30	<0.05	24	88.89	<0.05	21	91.30	<0.05
C-D	23	16	69.57		14	60.87		20	74.07	
淋巴结转移										
无	27	26	96.30	<0.05	24	88.89	<0.05	21	91.30	<0.05
有	23	16	69.57		14	60.87		20	74.07	

■名词解释

基质金属蛋白酶 (MMPs): 是一组锌离子依赖的内分泌蛋白酶家族, 已经发现MMPs家族成员达20多种, 参与了许多生理及病理过程, 如炎症、组织纤维化和新生血管形成, 尤其是肿瘤的发生及转移均与MMPs的表达和活化有关。

现伴淋巴结转移的胃癌P15阳性率为13.8%, 无淋巴结转移的胃癌阳性率为52.9%, 无转移组原发性癌中P15表达水平显著高于有转移组. 我们在结肠癌及其转移淋巴结的研究中, 也发现恶性程度高、Dukes分期晚、伴淋巴结转移组P15、P16表达明显减低, 提示P15、P16基因的失活, 促进了肿瘤的转移.

P15与P16基因位置相邻, 均位于9p21, 二者基因编码核苷酸序列有93%相同, 其相应产物90%有同源性, 但二者生物学行为并不完全相同. P15可受生长转化因子 β (TGF- β)诱导使表达增多30倍, 而P16则不受TGF- β 所诱导, P16表达水平受Rb转录因子反馈调节, 而P15表达则不为Rb转录因子所调控. 有研究认为, 两者表达无明显相关性, 二者失活存在不同机制, 在肿瘤发生中作用不完全相同^[10], 另有学者认为两者具有协同性^[11]. 本研究结果显示, P15和P16在结肠癌中有相关性, 证明二者协同缺失更易导致细胞周期调控失调, 二者功能可能有互补作用. P15和P16低表达与结肠癌密切相关, 通过基因治疗方法增加P15和P16蛋白表达, 有助于缓解结肠癌的发展进程.

MMP-9是MMPs家族的重要成员, 由SoPata和Dancewicz于1974年从中性粒细胞提纯获得的

一种蛋白酶, 于1989年正式命名^[12], 其分子质量最大, 能够降解、破坏细胞外基质中最主要的组成成分IV、V型胶原和明胶^[13]. David *et al*^[14]采用免疫组化法研究发现, 与正常胃黏膜相比, 胃癌组织MMPs表达明显升高, MMPs与胃癌病期显著相关. Sier *et al*^[15]研究结果显示, 胃癌组织MMP-9表达显著高于邻近的正常胃黏膜, 其高表达胃癌患者生存期明显缩短. 近年来, 国内许多学者对MMP-9也有较深入的研究, 如彭利 *et al*^[16]认为, MMP-9与原发肝癌侵袭转移相关. 钱颀 *et al*^[17]认为MMP-9在胃癌的侵袭与转移中起重要作用.

本结果表明, 结肠癌标本切缘组织中MMP-9无表达, 而癌旁3 cm组织和癌组织的阳性表达率分别为44.00%和82.00%, 有显著性差异($P < 0.05$). 张明林 *et al*^[18]的研究中有类似发现. 这说明肿瘤细胞获得恶性表型的同时具备了降解基底膜和向周围组织浸润转移的能力, MMP-9可能参与了结肠癌的发生、发展过程. 观察切片发现MMP-9阳性的癌细胞呈灶状或片状分布, 且多位于癌边缘或管腔近旁, 提示, 具有转移潜能的癌细胞多位于肿瘤结节的表面或周边, 因而也符合肿瘤细胞向周边侵袭、脱落并向远处转移的假说. Dukes A-B期有淋巴结转

■同行评价

本文通过对50例结肠癌组织、癌旁3cm组织及切缘正常组织中P15、P16和MMP-9表达情况的研究,探讨了P15、P16和MMP-9与结肠癌临床病理特征的关系,结果表明三者与结肠癌的侵袭、转移密切相关,为临床上对结肠癌恶性程度及预后的判断提供了重要依据。

移组阳性率51.85%, C-D期无淋巴结转移组阳性率86.96%, 具有显著性差异($P<0.05$); 由于Dukes分期可以反映肿瘤浸润和转移的程度, 因此, MMP-9的表达与肿瘤组织的侵袭性呈正相关, 这也说明MMP-9在结肠癌的发展、浸润和转移过程中发挥了重要作用。国外学者在胃癌中有类似发现, 与国内张明林 *et al*^[18]的研究结果一致^[19-26]。

本研究还发现, P15、P16与MMP-9在结肠癌细胞的表达呈负相关, 即MMP-9阳性率越高, P15、P16阳性率越低, P15、P16阳性/MMP-9阴性组发生淋巴结转移和浆膜浸润的机会显著低于其他任何组, 从而可以推测P15、P16与MMP-9在结肠癌的发生、发展过程中存在相互关联、共同作用。所以联合检测P15、P16与MMP-9在判断肿瘤生物学行为及预后方面有更大意义。

4 参考文献

- Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavtigian SV, Stockert E, Day RS 3rd, Johnson BE, Skolnick MH. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 1994; 264: 436-440
- Kang GH, Shim YH, Jung HY, Kim WH, Ro JY, Rhyu MG. CpG island methylation in premalignant stages of gastric carcinoma. *Cancer Res* 2001; 61: 2847-2851
- Tsujie M, Yamamoto H, Tomita N, Sugita Y, Ohue M, Sakita I, Tamaki Y, Sekimoto M, Doki Y, Inoue M, Matsuura N, Monden T, Shiozaki H, Monden M. Expression of tumor suppressor gene P16(INK4) products in primary gastric cancer. *Oncology* 2000; 58: 126-136
- Zhao GH, Li TC, Shi LH, Xia YB, Lu LM, Huang WB, Sun HL, Zhang YS. Relationship between inactivation of P16 gene and gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2003; 9: 905-909
- Li FC, Li YH, Zhao X, Fu WN, Xu ZM, Li ZG, Sun KL. Association of homozygous deletion of P15 and P16 gene and amplification of EGFR gene in laryngeal squamous cell carcinoma. *Yi Chuan Xue Bao* 2004; 31: 109-113
- Qin Y, Liu JY, Li B, Sun ZL, Sun ZF. Association of low P16INK4a and P15INK4b mRNAs expression with their CpG islands methylation with human hepatocellular carcinogenesis. *World J Gastroenterol* 2004; 10: 1276-1280
- 李庚, 千新来, 崔静, 王中群, 冶亚平, 杨晓煜, 李永真. DNA甲基化对大肠癌相关基因表达的调控意义. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 1699-1703
- 张远, 王小强, 王金柱, 王旭升. 直肠癌P16蛋白表达的检测及其意义. *陕西肿瘤医学* 2001; 6: 105-107
- 肖鹏, 陈广斌, 白俊恒, 武步强. P16、P15基因在胃癌及转移淋巴结中的表达. *中国癌症杂志* 2002; 12: 293-300
- Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of P16 and P15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 1994; 54: 6353-6358
- Zhou M, Gu L, Yeager AM, Findley HW. Incidence and clinical significance of CDKN2/MTS1/P16ink4A and MTS2/P15ink4B gene deletions in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Hematol Oncol* 1997; 14: 141-150
- Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl* 1992; 1: 421-424
- Kumbla L, Bhadra S, Subbiah MT. Multifunctional role for fetuin (fetal protein) in lipid transport. *FASEB J* 1991; 5: 2971-2975
- David L, Nesland JM, Holm R, Sobrinho-Simoes M. Expression of laminin, collagen IV, fibronectin, and type IV collagenase in gastric carcinoma. An immunohistochemical study of 87 patients. *Cancer* 1994; 73: 518-527
- Sier CF, Kubben FJ, Ganesh S, Heerding MM, Griffioen G, Hanemaaijer R, van Krieken JH, Lamers CB, Verspaget HW. Tissue levels of matrix metalloproteinases MMP-2 and MMP-9 are related to the overall survival of patients with gastric carcinoma. *Br J Cancer* 1996; 74: 413-417
- 彭利, 王顺祥, 何宏涛, 张凤瑞, 唐瑞峰. 基质金属蛋白酶9与原发性肝癌侵袭转移关系的初步研究. *实用癌症杂志* 2003; 8: 35-37
- 钱颀, 刘南植, 程胜平. 胃癌组织Angiopoietin及MMP-9表达的意义. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 299-302
- 张明林, 许建明, 梅俏, 鲍峻峻. MMP-2和MMP-9蛋白在结肠癌中的表达. *世界华人消化杂志* 2005; 13: 2494-2497
- Ikeda S, Kimura H, Shibata T. Correlation between expression of MMP-7 in gastric submucosal invasive carcinoma and lymph node micrometastasis. *Rinsho Byori* 2002; 50: 196-201
- Ajisaka H, Fushida S, Yonemura Y, Miwa K. Expression of insulin-like growth factor-2, c-MET, matrix metalloproteinase-7 and MUC-1 in primary lesions and lymph node metastatic lesions of gastric cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48: 1788-1792
- Liu XP, Kawachi S, Oga A, Tsushimi K, Tsushimi M, Furuya T, Sasaki K. Prognostic significance of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) expression at the invasive front in gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 291-295
- Matsuoka T, Yashiro M, Sawada T, Ishikawa T, Ohira M, Hirakawa K, Chung YS. Effect of a matrix metalloproteinase inhibitor on a lymph node metastatic model of gastric cancer cells passaged by orthotopic implantation. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 213-218
- Yonemura Y, Endo Y, Fujita H, Kimura K, Sugiyama K, Momiyama N, Shimada H, Sasaki T. Inhibition of peritoneal dissemination in human gastric cancer by MMP-7-specific antisense oligonucleotide. *J Exp Clin Cancer Res* 2001; 20: 205-212
- Park MJ, Kim MS, Park IC, Kang HS, Yoo H, Park SH, Rhee CH, Hong SI, Lee SH. PTEN suppresses hyaluronic acid-induced matrix metalloproteinase-9 expression in U87MG glioblastoma cells through focal adhesion kinase dephosphorylation. *Cancer Res* 2002; 62: 6318-6322

电编 李琪 编辑 王晓瑜