

doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.002

View this article at: <http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.002>

LIFR 和 MMP12 在胆囊癌中的表达及其临床意义

赵凤庆, 陈帅, 邢丹

(嘉兴市第一医院肝胆外科, 浙江 嘉兴 314000)

[摘要] 目的: 探讨白血病抑制因子受体(leukemia inhibitory factor receptor, LIFR)、基质金属蛋白酶12(matrix metalloproteinase 12, MMP12)在胆囊癌组织中的表达及其临床意义。方法: 以免疫组织化学EnVision二步法检测胆囊癌及癌旁正常胆囊组织(各50例)的LIFR和MMP12的表达情况。结果: LIFR, MMP12在胆囊癌中表达的阳性率分别为38.0%, 36.0%, 在癌旁正常胆囊组织中表达的阳性率为82.0%, 86.0%; III~IV期胆囊癌LIFR, MMP12的阳性表达率为17.9%, 17.9%, I~II期胆囊癌LIFR, MMP12的阳性表达率为63.6%, 59.1%; 有淋巴结转移的胆囊癌LIFR, MMP12的阳性表达率为14.8%, 11.1%, 无淋巴结转移的胆囊癌LIFR, MMP12的阳性表达率为65.2%, 65.2%。结论: LIFR, MMP12在胆囊癌中的表达水平显著低于癌旁正常胆囊组织; LIFR, MMP12在III~IV期胆囊癌的表达水平低于I~II期胆囊癌, 在有淋巴结转移的胆囊癌中的表达水平低于无淋巴结转移者。LIFR, MMP12表达水平的下降在胆囊癌的发生、发展及转移过程中可能起重要作用。

[关键词] 胆囊癌; 白血病抑制因子受体; 基质金属蛋白酶12; 免疫组织化学

Expressions of LIFR and MMP12 in gallbladder carcinoma and its clinical significance

ZHAO Fengqing, CHEN Shuai, XING Dan

(Department of Hepatobiliary Surgery, The First Hospital of Jiaxing, Jiaxing Zhejiang 314000, China)

Abstract **Objective:** To investigate the expressions and clinical significances of leukemia inhibitory factor receptor (LIFR), matrix metalloproteinase 12 (MMP12) in gallbladder carcinoma. **Methods:** Immunohistochemical staining methods (EnVision) were used to detect the expressions of LIFR, and MMP12 in gallbladder carcinoma and the matched normal gallbladder lesion cases (50 cases for each). **Results:** The expressions of LIFR, MMP12 were identified in 38.0%, 36.0% of gallbladder carcinoma cases, and 82.0%, 86.0% of matched normal gallbladder lesion cases. Among the 50 cases of gallbladder carcinoma, the expressions of LIFR, MMP12 were identified in 17.9%, 17.9% of stage III-IV gallbladder carcinoma, and 63.6%, 59.1% of stage I-II gallbladder carcinoma; the expressions of LIFR, MMP12 were identified in 14.8%, 11.1% of gallbladder carcinoma combined lymph node metastases, and 65.2%, 65.2% of gallbladder carcinoma without lymph node metastases. **Conclusion:** The expressions of LIFR, MMP12 in gallbladder carcinoma were significantly lower than those in matched normal gallbladder lesions. Expressions of LIFR and MMP12 in stage III-IV gallbladder carcinoma were lower than those

收稿日期 (Date of reception): 2018-02-03

通信作者 (Corresponding author): 陈帅, Email: 250950548@qq.com

in stage I-II gallbladder carcinoma. Expressions of LIFR and MMP12 in gallbladder carcinoma combined lymph node metastases were lower than those in gallbladder carcinoma without lymph node metastases. The lower expressions of LIFR, MMP12 may play an important role in the fields of occurrence, development and metastasis of gallbladder carcinoma.

Keywords gallbladder carcinoma; leukemia inhibitory factor receptor; matrix metalloproteinase 12; immunohistochemistry

胆囊癌是一种预后极差的恶性肿瘤, 患者5年生存率低于5%, 中位生存期<6个月^[1]。由于胆囊癌在早期缺少特异性的症状及体征, 大部分患者确诊时已经是中晚期。而早期胆囊癌患者行根治性切除术后的5年生存率要明显提高, 因此如何提高早期胆囊癌的诊断率尤为重要^[2]。研究^[3-7]表明: 白血病抑制因子受体(leukemia inhibitory factor receptor, LIFR)和基质金属蛋白酶12(matrix metalloproteinase 12, MMP12)在白血病、肺癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤组织中表达失调。但胆囊良恶性病变组织中LIFR及MMP12表达水平是否同样存在差异, LIFR和MMP12的表达是否也与胆囊癌的发生、发展及转移密切相关, 国内外相关研究报道甚少。本研究采用免疫组织化学EnVision法分别检测胆囊癌及胆囊癌旁正常组织中的LIFR和MMP12的表达水平, 比较其表达差异, 以探讨LIFR和MMP12的临床应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

以购自上海芯超生物科技有限公司的50例胆囊癌手术患者的术后组织标本作为研究对象。该批生物标本取自上海东方肝胆医院2010年6月至2017年6月经手术切除的胆囊癌标本, 有完善的病例资料及术后随访资料, 且已获得上海东方肝胆医院医学伦理委员会审核批准, 其中男22例, 女28例, 年龄 68.0 ± 8.2 (41~80)岁。50例患者术前未进行过任何化疗或放疗等干预性治疗, 术后病理类型均为胆囊腺癌, 且不含其他肿瘤疾病。癌旁2 cm正常胆囊组织作为对照组, 病理证实无癌细胞浸润。组织的病理诊断标准参照WHO肿瘤分类^[8]。根据美国癌症联合委员会(American Joint Committee on Cancer, AJCC)与国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control, UICC)联合制定的胆囊癌TNM分期标准^[9], 50例胆囊癌患者中I~II期胆囊癌22例, III~IV期胆囊癌28例; 无淋巴结转移23例, 有淋巴结转移27例。组织标本均经10%甲醛水溶液固定, 石蜡包埋, HE及免疫

组织化学染色诊断。

Anti-LIFR(产品编码: ab101228), Anti-MMP12(产品编码: ab137444)两种兔抗人多克隆抗体购自英国Abcam公司, EnVision二步法试剂盒购自上海基因科技股份有限公司, 产品说明书所注阳性对照物作为阳性对照, PBS缓冲液取代一抗作为阴性对照。

1.2 方法

1.2.1 切片预处理

所有胆囊癌标本石蜡切片后经二甲苯脱蜡, 乙醇梯度水化。免疫组织化学检测两种蛋白所需的抗原修复步骤如下: 石蜡切片在10 mmol/L, pH 6.0的柠檬酸缓冲液中加热20 min, 室温下冷却20 min。

1.2.2 染色

用PBS洗3次, 每次2 min; 加1滴一抗, 室温放置60 min; 用PBS洗3次, 每次2 min; 加1滴检测试剂, 室温放置30 min; 用PBS洗3次, 每次2 min; DAB显色10 min; 苏木精复染, 脱水, 封片。

1.3 结果判断

LIFR以细胞膜上出现棕黄色染色为阳性表达, MMP12以细胞外基质上出现棕黄色颗粒为阳性表达。评分判定均参照免疫反应积分(immunoreactive score, IRS)半定量法。染色强度计分: 无着色为0分, 淡黄色为1分, 棕黄色为2分, 棕褐色为3分。阳性分布范围计分: 阳性细胞染色百分比=阳性细胞数/细胞总数 $\times 100\%$; 阳性细胞数<5%为阴性, 5%~25%为1分, >25%~50%为2分, >50%~75%为3分, >75%为4分。以上2项结果相乘: 0分记为阴性(-), 1~2分记为弱阳性(+), 3~6分记为中等阳性(++), >6分记为强阳性(+++)。切片染色结果均采用双人双盲法半定量观察, 两人分数不一即取平均值。

1.4 统计学处理

采用SPSS 13.0统计软件进行数据分析, 所得患者的临床病理资料参数与LIFR, MMP12表达阳

性率的比较采用 χ^2 检验或Fisher确切概率法; 两种蛋白表达的相关性分析采用Spearman等级相关分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 LIFR 在胆囊癌及癌旁组织中的表达

LIFR的阳性定位均主要在细胞膜上。胆囊癌组织的HE染色及LIFR免疫组织化学染色(图1)。癌旁正常胆囊组织HE染色及LIFR免疫组织化学染色(图2)。LIFR在胆囊癌中的表达水平显著低于癌旁正常胆囊组织(表1)。LIFR在胆囊癌组织中的表达与患者的性别、年龄均无关, 在III, IV期胆囊癌的表达水平低于I, II期胆囊癌; 在有淋巴结转移胆囊癌的表达水平低于无淋巴结转移的胆囊

癌, 在中低分化胆囊癌的表达水平要低于高分化胆囊癌(表2)。

2.2 MMP12 在胆囊癌及癌旁组织中的表达

MMP12的阳性定位均主要在细胞外基质上。胆囊癌细胞外基质的HE染色及MMP12免疫组织化学染色(图3)。癌旁正常胆囊组织细胞外基质的HE染色及MMP12免疫组织化学染色(图4)。MMP12在胆囊癌中的表达水平显著低于癌旁正常胆囊组织(表3)。MMP12在胆囊癌组织中的表达与患者的性别、年龄均无关, 在III, IV期胆囊癌的表达水平低于I, II期胆囊癌, 在有淋巴结转移胆囊癌的表达水平低于无淋巴结转移的胆囊癌, 在中低分化胆囊癌的表达水平要低于高分化胆囊癌(表4)。

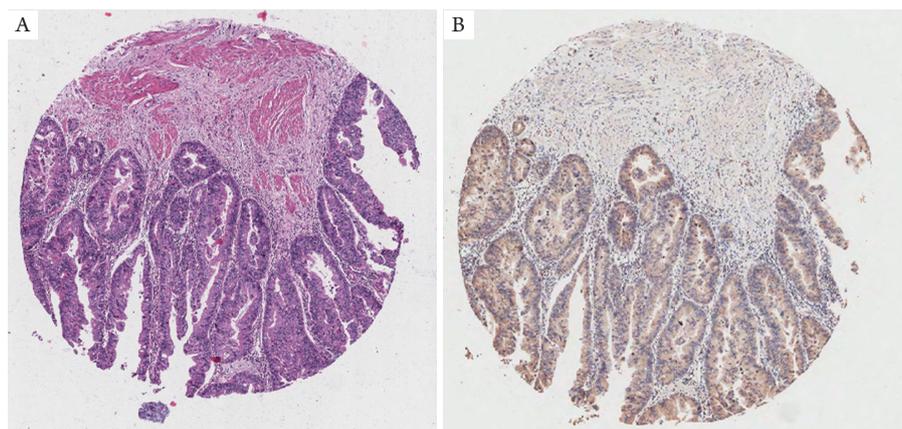


图1 胆囊癌HE染色(A)和LIFR (+) (EnVision)(B)($\times 100$)

Figure 1 HE staining (A) and LIFR (+) (EnVision) (B) of gallbladder carcinoma ($\times 100$)

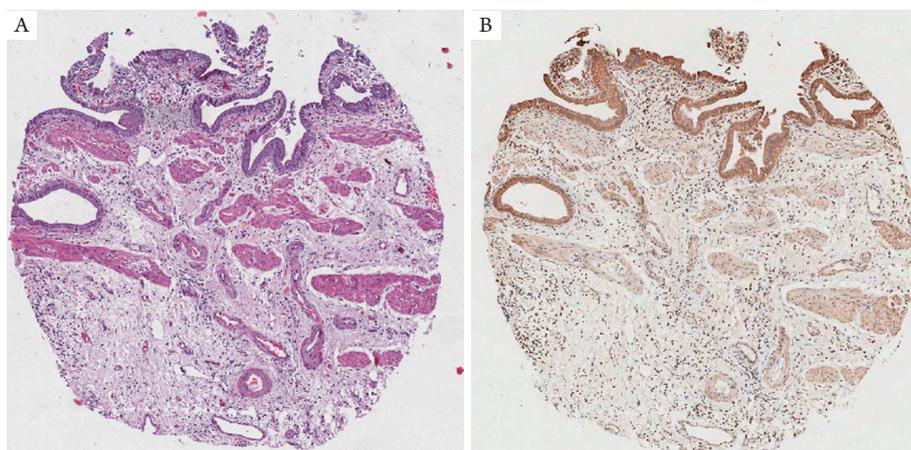


图2 癌旁正常组织HE染色(A)和LIFR(+++)(EnVision)(B)($\times 100$)

Figure 2 HE staining (A) and LIFR (+++) (EnVision) (B) of normal gallbladder lesions ($\times 100$)

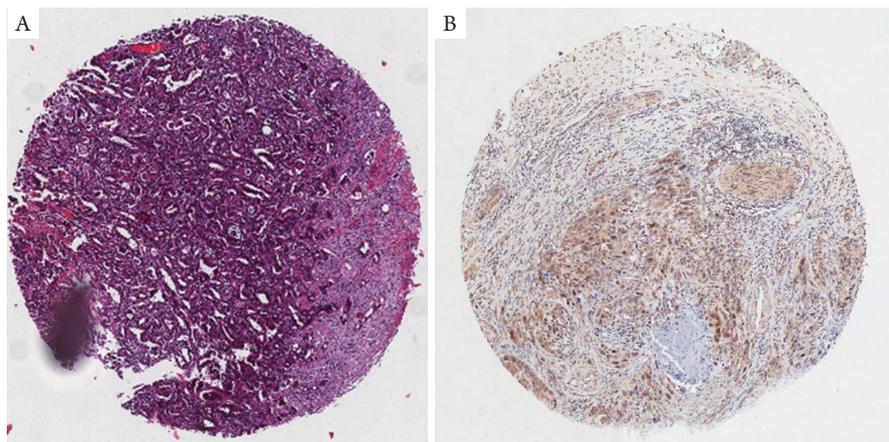
表1 LIFR在胆囊癌及其癌旁正常组织中的表达($n=50$)Table 1 Expression of LIFR in gallbladder carcinoma and matched normal gallbladder lesions ($n=50$)

组织类型	(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率/%
胆囊癌	31	11	6	2	38.0
癌旁正常组织	9	8	12	21	82.0
χ^2					20.17
P					<0.001

表2 LIFR的表达与胆囊癌临床病理特征的关系

Table 2 Relationship between expression of LIFR in gallbladder carcinoma and clinicopathological features of gallbladder carcinoma

临床病理特征	n	LIFR阳性/[例(%)]	χ^2	P
性别			0.04	0.833
男	22	8 (36.4)		
女	28	11 (39.3)		
年龄/岁			0.03	0.923
≤ 60	18	7 (38.9)		
>60	32	12 (37.5)		
临床分期			10.96	0.001
I~II	22	14 (63.6)		
III~IV	28	5 (17.9)		
淋巴结转移			11.34	0.0003
有	27	4 (14.8)		
无	23	15 (65.2)		
分化程度			10.61	0.001
高分化	15	11 (73.3)		
中、低分化	35	8 (22.9)		

图3 胆囊癌HE染色(A)和MMP12(+)(EnVision)(B)($\times 100$)Figure 3 HE staining (A) and MMP12 (+) (EnVision) (B) of gallbladder carcinoma ($\times 100$)

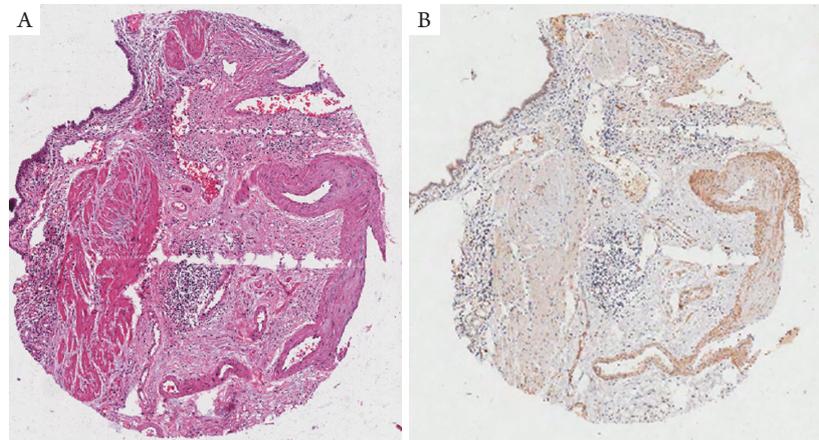


图4 癌旁正常组织HE染色(A)和MMP12(+++)(EnVision)(B)(×100)

Figure 4 HE staining (A) and MMP12 (+++) (EnVision) (B) of normal gallbladder lesions (×100)

表3 MMP12在胆囊癌及其癌旁正常组织中的表达(n=50)

Table 3 Expression of MMP12 in gallbladder carcinoma and matched normal gallbladder lesions (n=50)

组织类型	(-)	(+)	(++)	(+++)	阳性率/%
胆囊癌	32	10	6	2	36.0
癌旁正常组织	7	11	21	11	86.0
χ^2			21.38		
P			<0.001		

表4 MMP12的表达与胆囊癌临床病理特征的关系

Table 4 Relationship between expression of MMP12 in gallbladder carcinoma and clinicopathological features of gall bladder carcinoma

临床病理特征	n	MMP12阳性/[例(%)]	χ^2	P
性别			0.03	0.962
男	22	8 (36.4)		
女	28	10 (35.7)		
年龄/岁			0.04	0.768
≤60	18	6 (33.3)		
>60	32	12 (37.5)		
临床分期			9.78	0.003
I~II	22	13 (59.1)		
III~IV	28	5 (17.9)		
淋巴结转移			11.35	0.0001
有	27	3 (11.1)		
无	23	15 (65.2)		
分化程度			10.96	0.0007
高分化	15	12 (80.0)		
中、低分化	35	7 (20.0)		

2.3 LIFR, MMP12 在胆囊癌及癌旁组织中的表达相关性

Spearman 等级相关性分析显示: LIFR, MMP12 两种蛋白表达阳性率在不同组织类别中(包括淋巴转移、分期、癌旁正常组织)的表达呈正相关($r=0.95$, $P=0.004$; 表5)。

表5 LIFR和MMP12在胆囊癌及其癌旁组织中的表达相关性

Table 5 Correlation of expression between LIFR and MMP12 in gallbladder carcinoma and matched normal gallbladder lesions

组织类型	n	LIFR阳性/ [例(%)]	MMP12阳性/ [例(%)]
淋巴结转移			
有	27	4 (14.8)	3 (11.1)
无	23	15 (65.2)	15 (65.2)
胆囊癌			
I-II期	22	14 (63.6)	13 (59.1)
III-IV期	28	5 (17.9)	5 (17.9)
癌旁正常组织	50	41 (82.0)	43 (86.0)

3 讨论

恶性肿瘤的发生、发展及转移过程中伴随着多种基因的表达失调, 如原癌基因的激活及抑癌基因的失活等。LIFR即识别白血病抑制因子(LIF)的受体, 其中的低亲和力受体为LIFR α 链, 其结构属于红细胞生成素受体家族成员, 含有2个该家族特征性结构域; 高亲和力受体由 α 链和gp130(CD130)组成。LIFR分布较广泛, 如脂肪细胞、成骨细胞、神经细胞、胚胎癌细胞、胚胎干细胞、M1白血病细胞以及活化的巨噬细胞等。LIF通过LIFR进行信号转导并发挥作用。其作用主要有: 1) 调节细胞的增殖、分化和表型。LIF抑制小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES)的分化, 对造血系统中的肿瘤细胞, LIF常显示出抑制效应, 同时诱导这些肿瘤细胞分化, 例如LIF可抑制小鼠白血病M1细胞的增殖, 诱导其转变为巨噬细胞表型, 如表达Fc受体, 并获得吞噬能力等; 对单核细胞的分化也起超诱导作用, LIF与粒细

胞巨噬细胞克隆刺激因子(GM-CSF)、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)或IL-6协同抑制急性早幼粒细胞白血病HL-60和成单核细胞白血病U937细胞的生长, 并诱导其分化。LIF可增强IL-3对巨核细胞前体的造血干细胞的致有丝分裂作用, 从而提高体内巨核细胞和血小板的数量。LIF还可促进成肌细胞的增殖, 在一定条件下, LIF可促进新生大鼠背根神经节中的神经元表型从肾上腺素能型转变为胆碱能型, 因此LIF又称为胆碱能神经元分化因子(cholinergic neuronal differentiation factor, CNF)。此外, LIF还可促进移植神经嵴分化的胚胎性神经元的存活。2) 抑制脂蛋白脂酶活性, 降低3T3-L1脂肪细胞对游离脂肪酸的摄取。3) 促进骨重吸收, 这种作用可能是通过LIF刺激成骨细胞合成前列腺素介导的。4) 诱导肝急性期蛋白产生。除上述作用外, 近年来有研究^[3-4]认为LIFR在其他恶性肿瘤转移过程中也起抑制作用。Li^[3]研究发现: LIFR的表达下调可导致乳腺癌转移, 恢复高度恶性的乳腺癌细胞中LIFR的表达可抑制癌细胞转移。Johnson等^[4]对乳腺癌组织中LIFR表达水平进行研究发现: LIFR水平随乳腺癌的骨转移而降低。本研究发现LIFR在胆囊癌组织中的表达水平显著低于癌旁正常胆囊组织, 并在不同分期胆囊癌、有无淋巴结转移胆囊癌组织中的表达存在差异性, 提示LIFR表达水平的失调在胆囊癌的发生、发展以及转移过程中可能同样起重要作用。

恶性肿瘤的基本生物学特征是浸润生长和转移。转移的基本过程为早期形成原发灶, 并生成肿瘤相关血管, 肿瘤细胞先脱落并侵入基质, 肿瘤细胞侵入脉管系统, 形成癌栓, 生长成转移灶。癌细胞对细胞外基质的降解和基底膜穿透、肿瘤相关新生血管的生成是浸润和转移的起始, 也是最关键的步骤。这个过程中, 基质金属蛋白酶家族(MMPs)是降解细胞外基质最重要的蛋白酶。MMP12是MMPs众多成员之一。基质金属蛋白酶也称巨噬细胞弹性蛋白酶, 是一类结构中含Zn²⁺和Ca²⁺的蛋白水解酶类, 主要参与细胞外基质的代谢, 在血管形成、伤口愈合、肿瘤浸润和纤维化等方面起重要作用。目前发现的基质金属蛋白酶已超过14种, 这些酶类有许多共同的特性: 其催化机制依赖于含锌离子的活化中心; 以酶原形式泌出; 酶原需经蛋白酶等水解和修饰后才有活性; 结构相似, cDNA序列上显示同源性; 能裂解一种或多种细胞外基质; 可被金属蛋白酶组织抑制剂(tissue inhibitor of metalloproteinase,

TIMPs)或螯合剂乙二胺四乙酸二钠所抑制。研究^[5-7,9-11]表明: MMP12的表达失调与多种肿瘤的发生发展转移存在密切联系,且不同恶性肿瘤组织中MMP12的作用也不尽相同,这可能跟MMP12的来源不同有关。部分研究^[5-7]认为MMP12可促进肿瘤浸润、转移。Klupp等^[5]研究认为:结肠癌患者血清中MMP12的表达水平高于健康个体,血清中MMP12过表达的结肠癌患者表现出更短的生存周期,并认为血清中高水平的MMP12是提示结肠癌患者预后不良的标志物。Chung等^[6]研究发现:通过基因技术降低鼻咽癌组织中MMP12 mRNA的表达或使用MMP12特异性抑制剂PF-356231抑制MMP12的活性可显著降低鼻咽癌细胞的浸润和转移。Ng等^[7]通过检测肝癌患者和癌旁正常肝组织MMP12 mRNA水平发现:与癌旁正常肝组织相比,肝细胞性肝癌患者的肝肿瘤组织中MMP12 mRNA水平显著升高,MMP12 mRNA的高表达与HCC患者静脉浸润、高血清AFP水平、肿瘤的早期复发和总生存期均存在显著相关性;并认为MMP12 mRNA可能是肝癌患者的总生存期和肿瘤复发的有价值的预后标志物。也有研究^[10-11]认为MMP12可抑制肿瘤生长及转移。Houghton等^[10]因恶性肿瘤患者在化疗过程中使用合成TIMPs的临床试验失败,而构想某些MMPs实际上可以为个体防御恶性肿瘤的进展,并发现缺乏MMP12的小鼠比其野生型对照组显示出更多的肺癌转移灶,该小鼠模型中MMP12是有肿瘤相关的巨噬细胞所产生,而不是肿瘤细胞本身所产生,认为MMP12的存在可降低小鼠体内的肿瘤微血管密度,表明MMP12在抑制肺癌生长及转移的作用。Xu等^[11]则认为巨噬细胞MMP可以促进血管抑素生成,从而抑制小鼠结肠癌肿瘤血管生长,MMP的表达水平与肿瘤的生长速度呈负相关。本研究中,MMP12在胆囊癌的表达水平低于癌旁正常组织,并在不同分期胆囊癌、有无淋巴结转移胆囊癌组织中的表达存在差异性,推测MMP12表达水平的失调在胆囊癌的发生、发展以及转移过程中可能同样起重要作用。

综上所述,本研究分别检测LIFR及MMP12在胆囊癌及癌旁正常组织中的表达水平,结果提示胆囊癌的发生、发展及转移过程中同时伴随着LIFR及MMP12表达水平的失调。但由于这两种蛋白在多种恶性肿瘤中存在表达失调,缺乏特异性。未来仍需进一步研究LIFR,MMP12与胆囊癌的相关性,以期对胆囊癌的诊治及预后指导提供帮助。

参考文献

1. Duffy A, Capanu M, Abou-Alfa GK, et al. Gallbladder cancer (GBC): 10-year experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC)[J]. *J Surg Oncol*, 2008, 98(7): 485-489.
2. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, et al. *AJCC cancer staging manual*[M]. New York: Springer, 2010.
3. Li M. Targeting the LIFR-Hippo-YAP pathway as an anti-metastatic strategy[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(9 Suppl): BS2-2.
4. Johnson RW, Finger EC, Olcina MM, et al. Induction of LIFR confers a dormancy phenotype in breast cancer cells disseminated to the bone marrow[J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(10): 1078-1089.
5. Klupp F, Neumann L, Kahlert C, et al. Serum MMP7, MMP10 and MMP12 level as negative prognostic markers in colon cancer patients[J]. *BMC Cancer*, 2016, 16: 494.
6. Chung IC, Chen LC, Chung AK, et al. Matrix metalloproteinase 12 is induced by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and promotes migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 348.
7. Ng KT, Qi X, Kong KL, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-12 (MMP-12) correlates with poor prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Eur J Cancer*, 2011, 47(15): 2299-2305.
8. Bosman FT, Carneiro F, Hruban R, et al. *WHO classification of tumours of the digestive system*[R]. Lyon: International Agency For Research On Cancer, 2010: 1089.
9. 汤朝晖, 庄鹏远, 杨勇, 等. 胆囊癌AJCC第7版分期要点解读及规范应用[J]. *中国实用外科杂志*, 2011, 31(3): 221-223. TANG Chaohui, ZHUANG Pengyuan, YANG Yong, et al. Interpretation and standardized application of staging of gallbladder carcinoma AJCC seventh edition[J]. *Chinese Journal of Practical Surgery*, 2011, 31(3): 221-223.
10. Houghton AM, Grisolan JL, Baumann ML, et al. Macrophage elastase (matrix metalloproteinase-12) suppresses growth of lung metastases[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(12): 6149-6155.
11. Xu Z, Shi H, Li Q, et al. Mouse macrophage metalloelastase generates angiostatin from plasminogen and suppresses tumor angiogenesis in murine colon cancer[J]. *Oncol Rep*, 2008, 20(1): 81-88.

本文引用: 赵凤庆, 陈帅, 邢丹. LIFR和MMP12在胆囊癌中的表达及其临床意义[J]. *临床与病理杂志*, 2018, 38(8): 1601-1607. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.002

Cite this article as: ZHAO Fengqing, CHEN Shuai, XING Dan. Expressions of LIFR and MMP12 in gallbladder carcinoma and its clinical significance[J]. *Journal of Clinical and Pathological Research*, 2018, 38(8): 1601-1607. doi: 10.3978/j.issn.2095-6959.2018.08.002