

# 基质金属蛋白酶-9 与血管内皮细胞生长因子在肺腺癌中的表达\*

王 玲<sup>1</sup>, 王开金<sup>2,3</sup>, 黎 联<sup>2,3△</sup>, 黎晓强<sup>2,3</sup>, 李 敏<sup>3,4</sup> (1. 四川省自贡市第一人民医院急诊科 643000; 2. 重庆市江津区中心医院呼吸内科 402260; 3. 重庆市江津区呼吸疾病研究所 402260; 4. 重庆市江津区中心医院病理科 402260)

**【摘要】** 目的 研究基质金属蛋白酶-9(MMP-9)与血管内皮细胞生长因子(VEGF)在肺腺癌表达的相关性及意义。方法 应用免疫组织化学(SP)法检测 MMP-9、VEGF 在 30 例肺腺癌组织和 12 例癌旁正常组织中的表达。Western blot 检测 MMP-9 单克隆抗体阻断 MMP-9 后肺腺癌 A549 细胞 VEGF 蛋白表达水平的变化,以及 VEGF 单克隆抗体阻断 VEGF 后肺腺癌 A549 细胞 MMP-9 蛋白表达水平的变化。结果 MMP-9 在腺癌组织表达率为 63.3%,正常组织表达率为 16.7%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); VEGF 在腺癌组织表达率为 70%,正常组织表达率为 25%,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );肺腺癌组织 MMP-9 水平与 VEGF 表达率存在正相关关系( $r = 0.709 4$ ,  $P < 0.01$ ),并与肺腺癌的临床分期及淋巴转移状况相关( $P < 0.05$ )。VEGF 高表达率与肺腺癌的临床分期及淋巴转移状况相关( $P < 0.05$ )。用 MMP-9 单克隆抗体阻断 MMP-9 可降低 VEGF 蛋白表达水平,用 VEGF 单克隆抗体阻断 VEGF 可降低 MMP-9 蛋白表达水平。结论 VEGF、MMP-9 在肺腺癌高表达,在促进腺癌侵袭转移中具有协同作用。

**【关键词】** 肺腺癌; 基质金属蛋白酶-9; 血管内皮细胞生长因子

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.02.009 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)02-0161-03

**Study on expression of MMP-9 and VEGF in lung adenocarcinoma\*** WANG Ling<sup>1</sup>, WANG Kai-jin<sup>2,3</sup>, LI Lian<sup>2,3△</sup>, LI Xiao-qiang<sup>2,3</sup>, LI Min<sup>3,4</sup> (1. Department of Emergency, Zigong Municipal First People's Hospital, Zigong, Sichuan 643000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China; 3. Jiangjin District Institute of Respiratory Diseases, Chongqing 402260, China; 4. Department of Pathology, Jiangjin District Central Hospital, Chongqing 402260, China)

**【Abstract】** **Objective** To investigate the correlation between matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and vascular endothelial growth factor (VEGF) expressions in lung adenocarcinoma and its significance. **Methods** The immunohistochemistry (SP) was used to test the expressions of MMP-9 and VEGF in 30 specimens of lung adenocarcinoma and 12 specimens of normal paracancerous lung tissues. Western blot was used to detect the change of VEGF protein levels in lung adenocarcinoma A549 cells after blocking MMP-9 by MMP-9 mAb, and the change of MMP-9 protein levels in lung adenocarcinoma A549 cells after blocking VEGF by VEGF mAb. **Results** The high expression rate of MMP-9 protein in lung adenocarcinoma tissues was 63.3%, which in the normal tissues was 16.7%, the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ); the high expression rate of VEGF protein in lung adenocarcinoma tissues was 70%, which in the normal tissues was 25%, the difference had statistical significance ( $P < 0.05$ ); the high expression rate of MMP-9 in the lung adenocarcinoma was positively correlated with the high expression rate of VEGF ( $r = 0.709 4$ ,  $P < 0.01$ ), and which was correlated with the lymph node metastasis status and the clinical TNM stage ( $P < 0.05$ ). The high expression rate of VEGF was correlated with the lymph node metastasis status and the clinical TNM stage ( $P < 0.05$ ). Blocking MMP-9 by MMP-9 mAb could reduce the VEGF protein expression level. Blocking VEGF by VEGF mAb could reduce the MMP-9 protein expression level. **Conclusion** VEGF and MMP-9 are highly expressed in lung adenocarcinoma and have the synergistic action in promoting invasion and metastasis of lung adenocarcinoma.

**【Key words】** lung adenocarcinoma; MMP-9; VEGF

血管内皮生长因子(VEGF)是目前已知最重要的促血管生成因子之一,与肿瘤的生长和转移密切相关。基质金属蛋白酶 9(MMP-9)是一种与肿瘤侵袭和转移密切相关的蛋白酶,与血管形成过程中基底膜的降解关系密切。许多实验发现恶性肿瘤组织 MMP-9、VEGF 高表达,与淋巴转移及分期等密切相

关,但二者在肺癌的报道较少,两者在促进肿瘤侵袭、转移中的相互关系亦不清楚。本试验选取 30 例肺腺癌及 12 例癌旁正常组织标本,应用免疫组化方法检测 VEGF、MMP-9 表达。体外培养腺癌 A549,分别加 MMP-9、VEGF 单克隆抗体后检测 VEGF、MMP-9 的蛋白表达变化,以探讨二者在促进肺腺癌侵

\* 基金项目:重庆市自然科学基金面上项目(cstc2011jjA0961)。

作者简介:王玲,女,本科,主治医师,主要从事呼吸疾病研究。

△ 通讯作者, E-mail: lilian19700925@163.com。

袭转移的机制。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择重庆市江津区中心医院 30 例肺腺癌患者手术切除的肺癌标本(2009 年 3 月至 2012 年 3 月),12 例癌旁正常组织。所有标本均经 10% 甲醛固定,石蜡包埋,5 μm 厚连续切片。30 例肺腺癌患者中,男:女为 20:10,年龄范围 40~82 岁,>60 岁 14 例,≤60 岁的 16 例;病灶超过 3 cm 的 18 例,病灶小于或等于 3 cm 的 12 例;伴淋巴结转移 16 例,不伴淋巴结转移 14 例;所有病例术前未行放疗化疗,均有完整的病历资料;据美国联合癌症分类委员会(AJCC)和国际抗癌联盟(UICC)2002 年制定的肺癌临床分期标准<sup>[1]</sup>: I~II 期 13 例, III~IV 期 17 例。

**1.2 细胞系** 人肺腺癌 A549 由重庆医科大学基础医学研究所已有的细胞复苏而得,细胞在 37 ℃、5% CO<sub>2</sub>、含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养液中培养,0.1% 胰酶消化传代。

**1.3 主要试剂** RPMI1640 培养液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自天津 TBD 公司,鼠抗人 MMP-9、VEGF 单克隆抗体(mAb)购自 Santa Cruz 公司。辣根过氧化物酶标记的兔抗鼠、鼠抗人 β-actin 多克隆抗体、S-P 超敏免疫组化试剂盒、DAB 酶底物显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

**1.4 免疫组织化学** 按照免疫组化试剂盒说明书步骤进行 MMP-9(1:50)、VEGF(1:50)免疫组化染色,设正常肺组织对照组,同时用与一抗相应的免疫前血清 IgG 代替一抗作为阴性对照,用已知阳性的切片作阳性对照,结果判定参考黎联等<sup>[2]</sup>的方法。0~1 分为低表达组,≥2 分为高表达组。

**1.5 蛋白质印迹** 细胞传代稳定后分为 3 个组:A549, A549+MMP-9 mAb(5 μg/mL),A549+VEGF mAb(5 μg/mL)。待培养的细胞至 90% 汇合状态时,用 4 ℃ 的 PBS 冲洗细胞两次,加入裂解液 200 μL,冰上振荡 30 min,用细胞刮充分刮取细胞,离心提取上清总蛋白,按 1:4 加上样缓冲液后水煮沸 3~5 min,EP 管分装冻存。用 Bradford 法测蛋白浓度。以每孔 40 μg 蛋白上样,8% SDS-PAGE 电泳分离,湿式电转移至 PVDF 膜。5% 脱脂奶粉封闭液封闭 1 h,一抗(抗 VEGF、MMP-9)用 TBST 按 1:500 稀释,4 ℃ 孵育过夜,相应二抗 37 ℃ 孵育 1.5 h,化学发光法(ECL)检测条带,β-actin 作内参照,试验重复 3 次。

**1.6 统计学处理** SAS8.2 统计软件,行 Fisher 确切概率法, Spearman 相关分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

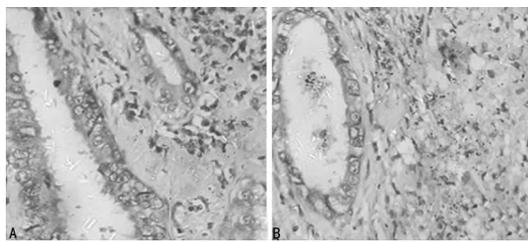
### 2 结果

**2.1 MMP-9、VEGF 在腺癌组织中的表达及相关性** 免疫组化结果显示,MMP-9 蛋白主要位于癌细胞胞质,呈棕黄色颗粒,高表达组占 63.3%(19/30),正常组织表达率 16.7%(2/12);VEGF 蛋白主要位于癌细胞胞质,呈棕黄色颗粒,高表达组占 70%(21/30),正常组织表达率 25%(3/12)(图 1)。在 21 例 VEGF 高表达病例中 MMP-9 高表达 18 例,而 9 例 VEGF 低表达病例中 MMP-9 高表达只有 1 例,MMP-9 与 VEGF 表达呈明显正相关( $r = 0.7094, P < 0.01$ )。

**2.2 肺腺癌组织 MMP-9、VEGF 表达与临床病理特征的关系** 统计结果显示,MMP-9、VEGF 表达水平在伴淋巴结转移的高于无淋巴结转移患者( $P < 0.05$ ),在 III~IV 期患者高于 I~II 期患者( $P < 0.05$ );MMP-9、VEGF 表达与患者的年龄、肿瘤大小无明显相关性( $P > 0.05$ )。见表 1。

**2.3 MMP-9 单克隆抗体阻断 MMP-9 后肺腺癌细胞 VEGF 蛋白表达的变化** 终浓度 5 μg/mL 的 MMP-9 mAb 处理

A549 细胞 24 h 后,Western blot 检测显示,VEGF 蛋白表达水平明显下降( $P < 0.05$ )(图 2)。

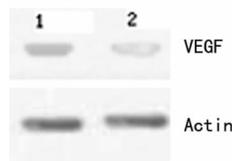


注:A 为 MMP-9 的表达,B 为 VEGF 的表达。

图 1 MMP-9 和 VEGF 在肺腺癌组织的表达(SP, ×200)

表 1 MMP-9、VEGF 表达与肺腺癌临床病理特征的关系(n)

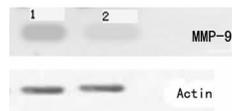
项目	MMP-9			VEGF		
	低表达	高表达	P	低表达	高表达	P
临床分期						
I + II	10	3	<0.01	9	4	<0.01
III + IV	1	16		0	17	
肿瘤大小(cm)						
≤3	6	6	0.266 3	5	7	0.418 1
>3	5	13		4	14	
年龄(岁)						
≤60	6	10	0.919 3	6	10	0.439 7
>60	5	9		3	11	
淋巴转移						
无	9	5		9	5	<0.01
有	2	14	0.006 8	0	16	



注:1 指 MMP-9 mAb 浓度是 0 μg/mL;2 指 MMP-9 mAb 浓度是 5 μg/mL。

图 2 MMP-9 mAb 处理 A549 细胞 24 h 后 VEGF 蛋白表达

**2.4 VEGF 单克隆抗体阻断 VEGF 后肺腺癌细胞 MMP-9 蛋白表达的变化** 终浓度 5 μg/mL 的 VEGF mAb 处理 A549 细胞 24 h 后,Western blot 检测显示,MMP-9 蛋白表达水平明显下降( $P < 0.05$ )(图 3)。



注:1 指 VEGF mAb 浓度是 0 μg/mL;2 指 VEGF mAb 浓度是 5 μg/mL。

图 3 VEGF mAb 处理 A549 细胞 24 h 后 MMP-9 蛋白表达

### 3 讨论

现已知 VEGF 作用于血管内皮细胞促进毛细血管的形成,并对新生血管的内皮细胞具有强烈的抗凋亡作用,在肿瘤的血管形成中具有核心作用。对胰腺癌的研究发现 VEGF 在

癌组织的表达明显升高,与淋巴转移、预后相关<sup>[3-4]</sup>。研究还发现肺癌组织中的 VEGF 表达显著高于良性及正常组织,癌组织中 VEGF 表达阳性者的微血管密度显著高于阴性者,腺癌组织中 VEGF 表达程度比鳞癌组织显著增高,这也许就是肺癌更易早期转移、进展迅速的原因之一<sup>[5-6]</sup>。

MMP-9 通过降解和破坏细胞基质中最重要的 IV、V 型胶原和明胶,以利于肿瘤血管向间质生长,肿瘤血管的微血管密度不断增加,肿瘤不断增长并向远处转移,在多种癌的侵袭转移中起着重要作用。对胰腺癌的研究表明 VEGF、MMP-9 在癌组织中的平均表达水平高于正常组织中的表达,提示 VEGF、MMP-9 与胰腺癌的发生相关,MMP-9、VEGF 的表达与胰腺癌有无淋巴结转移有相关性,表明 MMP-9、VEGF 在胰腺癌转移过程中起重要作用,二者大体保持同步的变化<sup>[7-8]</sup>。本研究也发现 MMP-9、VEGF 在肺腺癌高表达,与淋巴转移及临床分期呈正相关,二者表达呈正相关。

MMP-9、VEGF 在癌症发展中同步增高,二者之间的关系如何? Meadows 等<sup>[9]</sup>研究发现 VEGF 可以激活通过 RAS 活化 ERK 通路,乳腺癌细胞及肝细胞肝癌的细胞中 ERK 信号途径的活化能使 MMP-9 基因转录,乳腺癌细胞中 ERK 可活化 MMP-9,ERK 抑制剂 PD 98059 剂量依赖性抑制 MMP-9 表达,表明 MMP-9 可能是 ERK 信号途径的下游分子。本研究发现阻断 VEGF 后 MMP-9 明显下降,表明肺腺癌中 ERK 信号通路调控 MMP-9 的表达。李贞等<sup>[10]</sup>研究发现,基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 可以明显抑制鼠视网膜新生血管,明显下调 VEGF 的表达,猜测可能是抑制了 MMP-9,减弱了 MMP-9 分解细胞外基质,从而减少了 VEGF 释放。为了研究二者之间的相互作用关系,本研究体外培养肺癌细胞进行 Western blot 检测显示 A549 细胞有 VEGF 和 MMP-9 表达,单克隆抗体阻断 MMP-9 后,VEGF 的表达明显下降;单克隆抗体阻断 VEGF 后 MMP-9 也明显下降,表明 VEGF 和 MMP-9 存在相互促进表达的作用。

由此可见,VEGF 和 MMP-9 除了可以促进癌细胞侵袭转移外,二者之间存在相互刺激促进的信号途径,这样就构成了一个正反馈调节环路,促进肺癌血管增生、细胞的侵袭转移,但其中确切机制仍不清楚,而深入研究二者之间的调控机制,有助于对肺腺癌生长、浸润和转移机制的进一步认识,最终为肺腺癌的诊断、治疗和预后评价提供重要帮助。

参考文献

[1] 王吉耀. 内科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2011:124-125.  
 [2] 黎联,梅同华,周向东,等. 基质金属蛋白酶 26 蛋白在非小细胞肺癌组织中的表达及其意义[J]. 癌症,2009,28(1):76-81.  
 [3] Tang RF, Itakura J, Aikawa T, et al. Overexpression of lymphangiogenic growth factor VEGF-C in human pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2001, 22(3):285-292.  
 [4] Bogoevski D, Yekebas EF, Schurr D, et al. Mode of spread in the early phase of lymphatic metastasis in pancreatic ductal adenocarcinoma: prognostic significance of nodal microinvolvement[J]. Ann Surg, 2004, 240(6):993-1000.  
 [5] McDonnell CO, Hill ADK, McNamara DA, et al. Tumor micrometastases: The influence of angiogenesis[J]. Eur J Surg Oncol, 2000, 26(2):105-115.  
 [6] 叶超然. 血管内皮生长因子在非小细胞肺癌的表达及其意义[J]. 广西医科大学学报, 2001, 18(4):478-479.  
 [7] Nagakawa Y, Aoki T, Kasuya K, et al. Histologic features of venous invasion, expression of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9, and the relation with liver metastasis in pancreatic cancer[J]. Pancreas, 2002, 24(2):169-178.  
 [8] 李春龙,崔云甫,杜雪飞,等. VEGF 和 MMP-9 在胰腺癌侵袭转移中的表达及临床意义[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(9):1012-1016.  
 [9] Meadows KN, Bryant P, Pumiglia K. Vascular endothelial growth factor induction of the angiogenic phenotype requires ras activation[J]. J Biol Chem, 2001, 276(52):49289-49298.  
 [10] 李贞,施彩虹,倪卫杰. 基质金属蛋白酶抑制剂 GM6001 对鼠视网膜新生血管和 VEGF 表达的作用[J]. 上海交通大学学报:医学版, 2008, 28(6):665-668.

(收稿日期:2014-05-29 修回日期:2014-10-25)

(上接第 160 页)

儿 HIE 血清细胞因子变化及其与预后的关系[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(11):1896-1897.  
 [2] 陆叶,时春艳,国巍,等. 分娩时脐动脉血气分析的临床意义[J]. 中国妇产科临床杂志, 2009, 10(4):262-264.  
 [3] 陈慧卿,庄思齐. 脐血血气分析及其临床应用[J]. 国际儿科学杂志, 2007, 34(2):123-125.  
 [4] 中华医学会儿科学分会新生儿学组. 新生儿缺氧缺血性脑病诊断标准[J]. 中华儿科杂志, 2005, 43(8):584-584.  
 [5] 郭铭玉. 从细胞、亚细胞、分子水平探讨 HIE 的发病机制及其临床意义[J]. 实用诊断与治疗杂志, 2006, 20(1):1-4.  
 [6] Carter BS, Haverkamp AD, Merenstein GB. The definition of acute perinatal asphyxia[J]. Clin Perinatol, 1993, 20(2):287-304.  
 [7] 陈自励. 警惕新生儿窒息的误诊误治[J]. 中国实用妇科

与产科杂志, 2003, 19(6):321-322.  
 [8] 唐国红. 脐动脉血气分析及 Apgar 评分与新生儿窒息的相关性研究[J]. 中原医刊, 2007, 34(5):34-35.  
 [9] Shankaran S. Hypoxic-ischemic encephalopathy and novel strategies for neuroprotection[J]. Clin Perinatol, 2012, 39(4):919-929.  
 [10] Buratti S, Lampugnai E, Tuo P, et al. Congenital diaphragmatic hernia repair during whole body hypothermia for neonatal hypoxic ischemic encephalopathy[J]. J Perinatol, 2012, 32(12):981-984.  
 [11] 张玉华,唐文燕. 脐动脉血气分析对早产儿窒息判断的临床意义[J]. 实用临床医学, 2009, 10(9):81-82.  
 [12] 张玉华,张火连,唐文燕. 脐血血气综述[J]. 实用临床医学, 2008, 9(10):135-138.

(收稿日期:2014-06-16 修回日期:2014-10-30)