

CD147、OPN 和 MMP-2 在口腔鳞状细胞癌中的表达及意义

张弛¹, 满大鹏^{2△}, 马术明², 曹树文³, 李东文²

1. 四川大学华西口腔医学院(成都 610041); 2. 佳木斯大学附属第二医院 口腔科(佳木斯 154007);
3. 大庆油田总医院 病理科(大庆 163001)

【摘要】 目的 研究口腔鳞状细胞癌(OSCC)中基质金属蛋白酶诱导因子(CD147)、骨桥蛋白(OPN)和基质金属蛋白酶-2(MMP-2)的表达和意义。**方法** 采用免疫组化 SP 法对 35 例 OSCC 组织中 CD147、OPN 和 MMP-2 的表达进行检测,并分析这 3 个指标间的相关性。**结果** CD147、OPN 和 MMP-2 在 OSCC 组织中高表达,阳性表达率分别为 65.71%、71.43%、68.57%;三者的表达均与 OSCC 病理分级、临床分期和淋巴结转移有关($P < 0.05$),而与性别、年龄、生长部位无明显相关性($P > 0.05$);随着病理分级的降低、临床分期的增高和淋巴结转移,三者的阳性表达率均升高;三者之间的表达互呈正相关(MMP-2 和 CD147, $r = 0.653$; MMP-2 和 OPN, $r = 0.540$; CD147 和 OPN, $r = 0.381$; P 均 < 0.05)。**结论** CD147、OPN 和 MMP-2 的表达与 OSCC 的病理分级及侵袭转移密切相关。

【关键词】 基质金属蛋白酶诱导因子 骨桥蛋白 基质金属蛋白酶-2 口腔鳞状细胞癌

Expressions and Significances of CD147, OPN and MMP-2 in Oral Squamous Cell Carcinoma ZHANG Chi¹, MAN Da-peng^{2△}, MA Shu-ming², CAO Shu-wen³, LI Dong-wen². 1. West China School of Stomatology, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Stomatology, the Affiliated Hospital of Jiamusi University, Jiamusi 154007, China; 3. Department of Pathology, the General Hospital of Daqing Oil Field, Daqing 163001, China

△ Corresponding author, E-mail: 1535199960@qq.com

【Abstract】 Objective To evaluate the expressions and significances of CD147, OPN and MMP-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The expressions of CD147, OPN and MMP-2 were detected by immunohistochemical method (SP) in 35 cases of OSCC. The relationships between the expressions of CD147, OPN and MMP-2 and clinic histopathologic parameters of OSCC were analyzed. **Results** The expression rates of CD147, OPN and MMP-2 in OSCC tissues were 65.71%, 71.43% and 68.57% respectively. The expressions of CD147, OPN and MMP-2 were positively correlated with tumor histopathologic type, clinical stage and lymph node metastasis ($P < 0.05$), but not correlated with age, gender and the location of tumor ($P > 0.05$). The positive correlations were found among the expressions of CD147, OPN and MMP-2 (MMP-2 and CD147, $r = 0.653$; MMP-2 and OPN, $r = 0.540$; CD147 and OPN, $r = 0.381$; $P < 0.05$). **Conclusion** The expressions of CD147, OPN and MMP-2 increase in OSCC and may be the potential predictor of the malignant degree of OSCC.

【Key words】 Extracellular matrix metalloproteinase inducer Osteopontin Extracellular matrix metalloproteinase-2 Oral squamous cell carcinoma

侵袭和转移是恶性肿瘤最明显的特征之一,口腔颌面部的恶性肿瘤以鳞状细胞癌最为多见,一般占 80% 以上。近来研究^[1,2]表明,基质金属蛋白酶诱导因子(extracellular matrix metalloproteinase inducer, CD147)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)和基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)与许多实体肿瘤的发生发展关系密切,尤其在肿瘤的侵袭和转移中起着重要作用。本研究采用免疫组化 SP 法检测 35 例口腔鳞状细胞癌(oral

squamous cell carcinoma, OSCC)组织中 CD147、OPN 及 MMP-2 的表达情况,并探讨其与 OSCC 临床病理参数之间的关系,为 OSCC 临床病理研究、转移潜能预测以及开发新的治疗靶点提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 标本来源

收集大庆油田总医院病理科 2006~2008 年手术切除的 OSCC 标本 35 例,男性 21 例,女性 14 例,平均年龄 60 岁,低分化者 9 例,中分化者 11 例,高分化者 15 例,临床分期^[3] I 期和 II 期共 12 例, III 期

和Ⅳ期共 23 例,淋巴结转移者 16 例,淋巴结未转移者 19 例,所有患者术前均未接受放化疗,并同意标本用于科学研究。

1.2 试剂与免疫组化染色

兔抗人 CD147 多克隆抗体、兔抗人 OPN 多克隆抗体、鼠抗人 MMP-2 单克隆抗体和二抗试剂盒均购自福州迈新生物技术公司。免疫组织化学染色 SP 法检测 CD147、OPN 和 MMP-2 的表达,一抗滴度均为 1 : 100,具体步骤如下:68 ℃ 烤片 20 min;二甲苯脱蜡,梯度酒精脱水;阻断灭活内源性过氧化物酶;抗原修复;正常羊血清工作液封闭,倾去勿洗;滴加一抗 4 ℃ 冰箱孵育过夜(用 PBS 缓冲液代替一抗作阴性对照);滴加生物素标记二抗;滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液;DAB 反应染色,苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片,镜检。用已知鳞癌阳性切片(福州迈新提供)作阳性对照。

1.3 结果判断标准

所有切片均由 2 位病理医师双盲阅片。在显微镜下以细胞出现棕黄色颗粒判定为免疫组化阳性结果。在 400 倍视野下取细胞密集的 5 个不同视野,

计数阳性细胞占细胞总数的百分比,并根据阳性细胞数和显色强度分为:阴性(-),阳性细胞数<5%或无显色;弱阳性(+),阳性细胞 5%~50%或浅棕黄色;强阳性(++),阳性细胞>50%或棕黄色。将弱阳性和强阳性判断为阳性,计算阳性表达率。

1.4 统计学方法

两样本率比较采用秩和检验,CD147 和 OPN 表达与 MMP-2 表达之间的相关性分析采用 Spearman 等级相关分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CD147、OPN 及 MMP-2 在 OSCC 中的表达

CD147 在 OSCC 中主要表达于肿瘤细胞的胞膜和胞质,而在间质细胞中几乎无表达(图 1);MMP-2 主要表达于肿瘤细胞和间质细胞的细胞质(图 2);OPN 主要表达于肿瘤细胞的细胞质(图 3)。CD147、MMP-2 和 OPN 在 OSCC 中的阳性表达率分别为 65. 71% (23/35)、68. 57% (24/35) 和 71. 43%(25/35)。三者在癌旁正常口腔黏膜表达为阴性(图 4)。

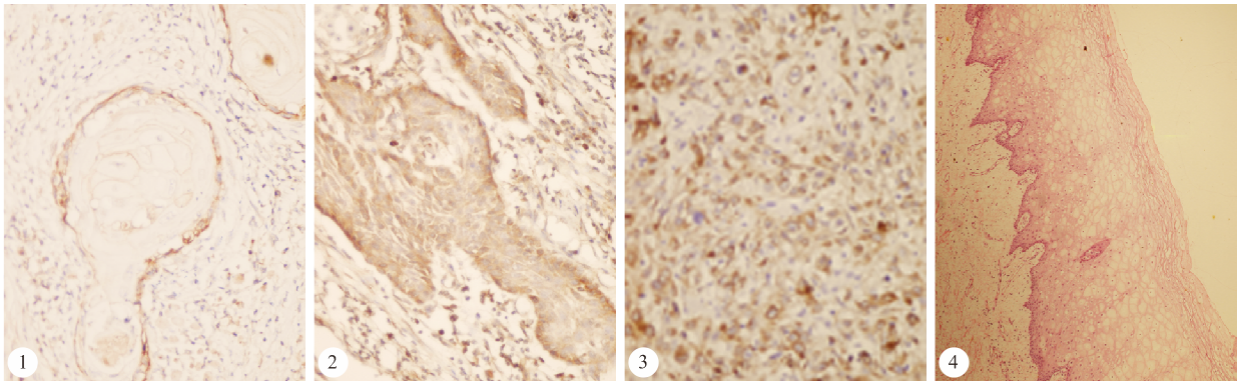


图 1 CD147 在 OSCC 中的表达。SP ×400 图 2 MMP-2 在 OSCC 中的表达。SP ×400 图 3 OPN 在 OSCC 中的表达。SP ×400
图 4 CD147、OPN 和 MMP-2 在癌旁正常口腔黏膜阴性表达。SP ×100
Fig 1 Expression of CD147 in OSCC. SP ×400 Fig 2 Expression of MMP-2 in OSCC. SP ×400 Fig 3 Expression of OPN in OSCC. SP ×400
Fig 4 Negative expression of CD147, OPN and MMP-2 in normal oral cavity mucous membrane. SP ×100

2.2 CD147、OPN 及 MMP-2 的表达与临床病理参数之间的关系

患者临床病理特点与癌组织标本表达 CD147、OPN 及 MMP-2 的关系见表 1;CD147、OPN 及 MMP-2 在 OSCC 不同年龄、性别、生长部位组间的表达差异无统计学意义 ($P>0.05$);而在不同病理分级组间、临床分期组间和有无淋巴结转移组间的表达差异有统计学意义 ($P<0.05$),随着病理分级的降低、临床分期的增高和淋巴结转移,三者的阳性

表达率均升高。
2.3 OSCC 中 CD147、OPN 及 MMP-2 表达的相关性分析

Spearman 等级相关分析显示(表 2、表 3),MMP-2 与 CD147、OPN 的 r 值分别为 0. 653 和 0. 540,CD147 与 OPN 的 r 值为 0. 381, P 值均<0. 05,说明 OSCC 中 CD147、OPN 及 MMP-2 三者之间具有相关性。

表 1 CD147、OPN 及 MMP-2 的表达与临床病理参数的关系

Table 1 Relationships between the expressions of CD147, MMP-2 and OPN and clinicopathologic parameters																
Parameter	n	CD147 expression			Positive rate (%)	P	OPN expression			Positive rate (%)	P	MMP-2 expression			Positive rate (%)	P
		—	+	++			—	+	++			—	+	++		
Sex						0.218					0.381				0.198	
Male	21	4	10	7	80.95		4	9	8	80.95		5	8	8	76.19	
Female	14	8	1	5	42.86		6	3	5	57.14		6	5	3	57.14	
Age						0.226					0.888				0.399	
≥60 yr.	16	6	7	3	62.50		5	5	6	68.75		7	4	5	56.25	
<60 yr.	19	6	4	9	68.42		5	7	7	73.68		4	9	6	78.95	
Part						0.684					0.804				0.089	
Tongue	15	5	4	6	66.67		3	7	5	80.00		6	7	2	60.00	
Else	20	7	7	6	65.00		7	5	8	65.00		5	6	9	75.00	
Pathological type						0.005					0.001				0.007	
Low	9	1	3	5	88.89		0	4	5	100.00		1	2	6	88.89	
Medium	11	1	5	5	90.91		1	3	7	90.91		2	5	4	81.82	
High	15	10	3	2	33.33		9	5	1	40.00		8	6	1	46.67	
Clinical stage						0.011					0.012				0.027	
I , II	12	8	2	2	33.33		8	1	3	33.33		7	3	2	41.67	
III , IV	23	4	9	10	82.61		2	11	10	91.30		4	10	9	82.61	
Lymphatic metastasis						0.005					0.002				0.001	
Absence	19	10	6	3	47.37		10	5	4	47.37		11	5	3	36.84	
Presence	16	2	5	9	87.50		0	7	9	100.00		0	8	8	100.00	

表 2 MMP-2 与 CD147、OPN 表达的关系

Table 2 Correlations between the expressions of MMP-2 and CD147, MMP-2 and OPN

MMP-2	n	CD147			r	P	OPN			r	P
		—	+	++			—	+	++		
—	11	9	2	0	0.653	0.000	6	5	0	0.540	0.001
+	13	3	4	6			3	4	6		
++	11	0	5	6			1	3	7		

表 3 CD147 和 OPN 表达的关系

Table 3 Correlation between the expressions of CD147 and OPN

CD147	n	OPN			r	P
		—	+	++		
—	12	7	3	2	0.381	0.024
+	11	1	5	5		
++	12	2	4	6		

3 讨论

细胞外基质(extracellular matrix, ECM)与肿瘤转移之间的关系一直是恶性肿瘤转移机制研究的热点之一,多年来,人们对此进行了大量研究,并取得了一定的进展。目前普遍认为,ECM 在肿瘤的转移中具有双重作用^[4],一方面 ECM 中某些成分可激活肿瘤细胞膜受体,通过信号传导机制使肿瘤细胞具有更强的迁移能力,另一方面它又是肿瘤细胞迁移必须经过的屏障;肿瘤细胞既要黏附于 ECM 作为迁移的载体,又要消化周边 ECM 为迁移打开通道。基质金属蛋白酶(MMPs)是主要的 ECM 降

解酶,在肿瘤侵袭转移中起重要作用。

MMP-2(又称明胶酶 A)是 MMPs 家族重要成员,是一个相对分子质量为 72×10^3 的Ⅳ型胶原酶和明胶酶,由肿瘤细胞和间质细胞以酶原形式分泌,经水解后激活,降解基底膜和包绕肿瘤的基质,主要通过降解破坏 ECM 中最重要的组成——Ⅳ、Ⅴ型胶原和明胶,形成局部溶解构成肿瘤细胞移动的通道,利于肿瘤浸润转移。本研究显示,MMP-2 的表达在低、中分化组明显高于高分化组,发生转移组明显强于未转移组,Ⅲ、Ⅳ期明显高于Ⅰ、Ⅱ期,这一结果与张壮等^[5]的研究结果基本一致,进而说明 MMP-2 在 OSCC 的侵袭转移过程中可能起重要作用,MMP-2 活性和表达的增加与 OSCC 侵袭转移生物学行为及患者预后相关。

CD147 是一类属于免疫球蛋白超家族的跨膜糖蛋白,相对分子质量约 58×10^3 ,在人体内广泛分布,具有多种生理功能。纯化的 CD147 可刺激成纤维细胞产生 MMP-1、MMP-2、MMP-3、膜型基质金属蛋白酶 1(MT1-MMP)、MT2-MMP,但是对 MT3-MMP、金属蛋白酶组织抑制因子 1(TIMp-1)、TIMp-2 的合成影响较小^[6]。CD147 可通过刺激间质细胞及肿瘤细胞本身产生多种 MMPs 来降解基底膜和 ECM,从而促进肿瘤的侵袭和转移。Sun 等^[7]研究发现 CD147 抗体可以抑制乳腺癌细胞株 MDA-435 之间的黏附,也可以抑制肿瘤细胞分泌 MMP-2 并降低肿瘤

细胞的浸润能力;本研究结果亦显示 CD147 表达与 MMP-2 表达呈正相关。CD147 在 OSCC 中高表达,且主要表达于肿瘤细胞的胞膜,也可见于细胞质,而在癌周间质少有表达,推测其原因可能是间质细胞未产生可以诱导 CD147 的相关因子;发生转移组的 CD147 表达明显强于未发生转移组,Ⅲ、Ⅳ期明显高于Ⅰ、Ⅱ期,低、中分化组明显高于高分化组,说明在 OSCC 中 CD147 的表达与肿瘤的临床分期、病理分级及侵袭转移密切相关。因此我们推测在 OSCC 中 CD147 可能通过刺激肿瘤周围间质细胞及肿瘤细胞本身产生 MMPs 而影响肿瘤的进展,二者共同参与了 OSCC 和其周围基质间的相互作用。而 CD147 在 OSCC 中促进 MMP-2 表达的机制尚需进一步研究。

OPN 是一种分泌型糖基化、磷酸化的非胶原蛋白质,是 ECM 中一种非胶原性黏附分子,1979 年 Senger 等首先报道恶性转化上皮细胞能分泌 OPN,随后学者们又在许多肿瘤中发现了它的踪影,并对此进行了进一步研究。Philip 等^[8]报道,OPN 通过激活 NF- κ B 信号转导通路,使 MMP-2 前体(pro-MMP-2)活化为 MMP-2,从而促进细胞迁移、ECM 降解以及肿瘤转移。Tuck 等^[9]研究证明,OPN 通过与整合素 $\alpha_v\beta_3$ 受体的结合,可以提高 MMP-2 的表达,从而导致肿瘤的形成和侵袭转移。体外研究^[10]显示,针对 OPN 的干扰 RNA(SiRNA)可以抑制结肠癌细胞株 CT26 的转移,此过程与 MMP-2 分泌减少有关。本研究表明在 OSCC 中 OPN 的表达与肿瘤的临床分期、病理分级及侵袭转移密切相关,临床分期越高、病理分级越低、发生转移的 OSCC 中 OPN 表达明显强于相应对照组。另外,本研究结果显示,在 OSCC 中 OPN 表达与 CD147 表达间呈正相关,可以推断 OPN 和 CD147 在肿瘤的进展过程中可能有一定的协同作用,国内外有关二者之间关系的报道罕见,Mi 等^[11]等利用流式细胞计量术和荧光共振能量转移技术,在乳腺癌中证明了 OPN 的羧基末端片段和另一个转移标记物(亲环素 C 或旋转异构酶)结合后,再与细胞表面的 CD147 结合,进而活化 Akt1/2 和 MMP-2。但是在 OSCC 中二者之间具体的作用机制还有待于进一步研究。

综上所述, MMP-2 活性受多因素的调节, CD147、OPN 均可刺激 MMP-2 活性增加,在 OSCC 中 CD147、OPN 及 MMP-2 的表达与肿瘤的侵袭转移密切相关,可作为 OSCC 侵袭转移生物学行为的

参考指标。检测三者的表达有助于对 OSCC 进行临床病理研究及转移潜势预测,有利于制定合理治疗方案以提高患者生存质量,具有重要临床意义。作为上游分子的 CD147 和 OPN,阻断其表达和活性可能成为 OSCC 治疗的新靶点。而在 OSCC 中 CD147、OPN 及 MMP-2 之间的相互作用机制及与 CD147 和 OPN 的产生相关的上游因子为何,尚需进一步研究。

参 考 文 献

- 1 Stewart CJ, Crook ML. CD147 (EMMPRIN) and matrix metalloproteinase-2 expression in uterine endometrioid adenocarcinoma. *Pathol Res Pract*, 2011; 207(1): 30-36.
- 2 Bhattacharya SD, Mi Z, Kim VM, *et al.* Osteopontin regulates epithelial mesenchymal transition-associated growth of hepatocellular cancer in a mouse xenograft model. *Ann Surg*, 2012; 255(2): 319-325.
- 3 邱蔚六, 张震康, 张志愿等. 口腔颌面外科学. 第 6 版. 北京: 人民卫生出版社, 2008; 287-288.
- 4 詹启敏, 曹 亚, 程 涛等. 分子肿瘤学. 第 1 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005; 485-486.
- 5 张 壮, 李宁毅, 陈万涛等. ColIV、Fn、MMP-2、uPA 在口腔鳞癌中的表达及意义. *中国口腔颌面外科杂志*, 2005; 3(3): 231-237.
- 6 Kanekura T, Chen X, Kanzaki T. Basigin (CD147) is expressed on melanoma cells and induces tumor cell invasion by stimulating production of matrix metalloproteinases by fibroblasts. *Int J Cancer*, 2002; 99(4): 520-528.
- 7 Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res*, 2001; 61(5): 2276-2281.
- 8 Philip S, Bulbule A, Kundu GC. Matrix metalloproteinase-2: mechanism and regulation of NF-kappa B-mediated activation and its role in cell motility and ECM-invasion. *Glycoconj J*, 2004; 21(8-9): 429-441.
- 9 Tuck AB, Chambers AF. The role of osteopontin in breast cancer: clinical and experimental studies. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*, 2001; 6(4): 419-429.
- 10 Wai PY, Mi Z, Guo H, *et al.* Osteopontin silencing by small interfering RNA suppresses *in vitro* and *in vivo* CT26 murine colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 2005; 26(4): 741-751.
- 11 Mi Z, Oliver T, Guo H, *et al.* Thrombin-cleaved COOH-terminal osteopontin peptide binds with cyclophilin C to CD147 in murine breast cancer cells. *Cancer Res*, 2007; 67(9): 4088-4097.

(2012-01-05 收稿, 2012-04-26 修回)

编辑 余 琳